

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 541**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2009 E 09794822 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2307459**

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

30 Prioridad:

07.11.2008 US 112699 P

07.11.2008 US 112701 P

08.07.2008 US 79095 P

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

17.03.2015

73 Titular/es:

ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

800 Chesapeake Drive

Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

GURNEY, AUSTIN L.;

HOEY, TIMOTHY CHARLES;

BRUHNS, MAUREEN FITCH y

AXELROD, FUMIKO TAKADA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 531 541 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de unión del receptor Notch1 y procedimientos de uso de los mismos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

[0001] La presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden un agente que se une a un receptor Notch humano y procedimientos de uso de las composiciones para caracterizar, diagnosticar y tratar cáncer y otras enfermedades. En particular, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhiben el crecimiento tumoral. La presente divulgación proporciona además procedimientos para tratar cáncer, comprendiendo los procedimientos administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de una proteína del receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral.

Antecedentes

[0002] El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo desarrollado, produciendo más de 500.000 muertes por año en los Estados Unidos solo. Más de un millón de personas se diagnostican con cáncer en los EE.UU. cada año, y en general se estima que más de 1 de cada 3 personas desarrollarán alguna forma de cáncer durante su vida. Aunque existen más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro de ellos, de mama, pulmón, colorrectal y de próstata, representan más de la mitad de todos los nuevos casos (Jemal y col., 2003, Cancer J. Clin 53:5-26).

[0003] El cáncer surge de la desregulación de los mecanismos que controlan el desarrollo y el mantenimiento tisular normal, y se cree que las células madre en aumento desempeñan una función central (Beachy y col., 2004, Nature 432:324). Durante el desarrollo normal de los animales, las células de la mayoría o todos los tejidos se derivan de precursores normales, llamados células madre (Morrison y col., 1997, Cell 88:287-98; Morrison y col., 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:216-21; Morrison y col., 1995, Annu. Rev. Cell Dev. Biol 11:35-71). Las células madre son células que: (1) tienen una extensa capacidad proliferativa; (2) son capaces de división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie con potencial proliferativo y/o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para la auto-renovación o auto-mantenimiento. El ejemplo más conocido de la renovación de células en adultos por la diferenciación de células madre es el sistema hematopoyético en el que los precursores en desarrollo inmaduros (células madre y progenitoras hematopoyéticas) responden a las señales moleculares para formar los tipos de células sanguíneas y linfoides variables. Otras células, incluyendo células del intestino, células de los conductos de la mama y la piel, se reponen constantemente de una pequeña población de células madre en cada tejido, y estudios recientes sugieren que la mayor parte de los otros tejidos en adultos también alojan células madre, incluyendo el cerebro.

[0004] Los tumores sólidos están compuestos de poblaciones celulares heterogéneas. Por ejemplo, los cánceres de mama son una mezcla de células cancerígenas y células normales, incluyendo células mesenquimatosas (del estroma), células inflamatorias y células endoteliales. Los modelos clásicos de cáncer soportan que todas las poblaciones de células cancerígenas fenotípicamente diferentes tengan la capacidad de proliferar y dar origen a un nuevo tumor. En el modelo clásico, la heterogeneidad de las células tumorales resulta de factores ambientales, además de mutaciones en curso dentro de las células cancerígenas que producen una población diversa de células tumorigénicas. Este modelo se basa en la idea de que todas las poblaciones de células tumorales tendrían algún grado de potencial tumorigénico (Pandis y col., 1998, Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129; Kuukasjrvi y col., 1997, Cancer Res. 57:1597-1604; Bonsing y col., 1993, Cancer 71:382-391; Bonsing y col., 2000, Genes Chromosomes & Cancer 28 : 173-183; Beerman H y col., 1991, Cytometry 12:147-54; Aubele M & Werner M, 1999, Analyt. Cell. Path 19:53; Shen L y col., 2000, Cancer Res. 60:3884).

[0005] Un modelo alternativo para la heterogeneidad de células de tumor sólido observada es que los tumores sólidos resultan de una "célula madre de tumor sólido" (o "célula madre cancerígena" de un tumor sólido) que posteriormente experimenta el desarrollo caótico a través de tanto rondas simétricas como asimétricas de las divisiones celulares. En este modelo de célula madre, los tumores sólidos contienen un subconjunto diferente y limitado (posiblemente incluso raro) de células que comparten las propiedades de las "células madre" normales, porque proliferan ampliamente y eficazmente dan lugar a tanto células madre de tumor sólido adicionales (auto-

renovación) como a la mayor parte de las células tumorales de un tumor sólido que carecen de potencial tumorigénico. De hecho, las mutaciones dentro de una población de células madre que viven mucho tiempo pueden iniciar la formación de células madre cancerígenas que se basan en el crecimiento y mantenimiento de tumores y cuya presencia contribuye al fallo de los actuales enfoques terapéuticos.

5

[0006] La naturaleza de la célula madre de cáncer se reveló por primera vez en el cáncer de la sangre, leucemia mieloide aguda (LMA) (Lapidot y col., 1994, Nature 367:645-8). Más recientemente se ha demostrado que los tumores de mama humanos malignos alojan similarmente una pequeña población diferente de células madre cancerígenas enriquecidas en la habilidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes. Se encontró que una población de células ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin está 50 veces más enriquecida en células tumorigénicas en comparación con células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj y col., 2003, PNAS 100:3983-8). La capacidad de aislar prospectivamente las células cancerígenas tumorigénicas ha permitido la investigación de rutas biológicas críticas que subyacen la tumorigenicidad en estas células, y así promete el desarrollo de mejores ensayos de diagnóstico y terapéuticos para pacientes con cáncer. Es hacia este propósito al que se dirige esta invención.

15

[0007] Las células madre normales y las células madre cancerígenas comparten la capacidad de proliferar y auto-renovarse, así no es sorprendente que varios genes que regulan el desarrollo de las células madre normales contribuyan a la tumorigénesis (revisado en Reya y col., 2001, Nature 414:105-111 y Taipale & Beachy, 2001, Nature 411:349-354). La presente divulgación identifica el receptor Notch, por ejemplo, Notch1, como un marcador de células madre cancerígenas, que participa en la ruta de señalización de Notch en el mantenimiento de células madre cancerígenas y como una diana para tratar cáncer mediante la eliminación de estas células tumorigénicas.

20

[0008] La ruta de señalización de Notch es uno de varios reguladores críticos de la formación del patrón embrionario, mantenimiento del tejido post-embrionario y la biología de la célula madre. Más específicamente, la señalización de Notch participa en el proceso de la inhibición lateral entre los destinos de la célula adyacente y desempeña una función importante en la determinación del destino de la célula durante las divisiones celulares asimétricas. La señalización de Notch no regulada está asociada a numerosos cánceres humanos en los que puede alterar el destino del desarrollo de las células tumorales para mantenerlas en un estado no diferenciado y proliferativo (Brennan y Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69). Así, la carcinogénesis puede avanzar usurpando los mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y la reparación tisular por poblaciones de células madre (Beachy y col., 2004, Nature 432:324).

30

[0009] El receptor Notch se identificó por primera vez en mutantes de *Drosophila* con haploinsuficiencia dando produciendo muescas en el margen del ala, mientras la pérdida de la función produce un fenotipo "neurogénico" letal embrionario en el que las células de la epidermis cambian el destino hacia el tejido neural (Moohr, 1919, Genet. 4:252; Poulson, 1937, PNAS 23:133; Poulson, 1940, J. Exp. Zool. 83:271). El receptor Notch es un receptor de transmembrana de un solo paso que contiene numerosas repeticiones similares a factor de crecimiento epidérmico (EGF) en tándem y tres repeticiones Notch/LIN-12 ricas en cisteína (LNR) dentro de un gran dominio extracelular (Wharton y col., 1985, Cell 43:567; Kidd y col., 1986, Mol. Cell Biol. 6:3094; revisado en Artavanis y col., 1999, Science 284:770). Las LNR y una cola del extremo C adicional de aproximadamente 103 aminoácidos del dominio extracelular se denominan en el presente documento la "región proximal de membrana". Esta región también se conoce como, y se denomina, la región reguladora negativa Notch (NRR).

35

40

[0010] Los receptores Notch de mamífero experimentan escisión para tanto formar el receptor maduro como la posterior unión del ligando para la activar la señalización aguas abajo. Una proteasa similar a furina escinde los precursores del receptor Notch durante la maduración para generar heterodímeros de yuxtamembrana que comprenden una subunidad extracelular no covalentemente asociada y una subunidad de transmembrana que se mantienen juntas en un estado auto-inhibidor. La unión del ligando alivia esta inhibición e induce la escisión del receptor Notch por una metaloproteasa de tipo ADAM y gamma-secretasa, la última de las cuales libera el dominio intracelular (ICD) en el citoplasma, permitiéndole translocarse al núcleo para activar la transcripción del gen. La escisión por ADAM se produce dentro del dominio de escisión de unión no de ligando dentro de la región reguladora negativa de yuxtamembrana (NRR) (véase la Figura 1A). En el receptor Notch1 esta región engloba de aproximadamente el aminoácido 1427 a aproximadamente el aminoácido 1732.

45

50

[0011] Se han identificado cuatro proteínas Notch de mamífero (Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4) y las mutaciones en estos receptores producen invariablemente anomalías del desarrollo y patologías humanas que incluyen varios cánceres como se describen en detalle a continuación (Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25).

55

[0012] El receptor Notch se activa por ligandos de membrana de un solo paso de la familia Delta, Dentada, Lag-2 (DSL). Existen cinco ligandos de Notch conocidos en mamíferos: similar a Delta 1 (DLL1), similar a Delta 3 (DLL3), similar a Delta 4 (DLL4), Jagged 1 y Jagged 2, caracterizados por un dominio DSL y repeticiones similares a EGF en tándem dentro del dominio extracelular. El dominio extracelular del receptor Notch interacciona con aquel de sus ligandos, normalmente en células adyacentes, produciendo dos escisiones proteolíticas de Notch; una escisión extracelular mediada por una proteasa ADAM (una desintegrina y metalopeptidasa) y una escisión dentro del dominio transmembrana mediada por gamma-secretasa. Esta última escisión genera el dominio intracelular Notch (ICD), que a continuación entra en el núcleo en el que activa el CBF1, el supresor sin pelo [Su(H)], familia Lag-2 (CSL) de los factores de transcripción como los principales efectores aguas abajo para aumentar la transcripción de los factores de transcripción de hélice-bucle-hélice básicos nucleares de la familia pílota y potenciadora de la escisión [E(spl)] (Artavanis y col., 1999, Science 284:770; Brennan y Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Iso y col., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543). También pueden existir en mamíferos rutas intracelulares alternativas en las que participa la proteína citoplásmica Deltex identificada en *Drosophila* (Martinez y col., 2002, Curr. Opin. Genet. Dev. 12:524-33), y esta ruta dependiente de Deltex puede actuar para suprimir la expresión de los genes diana Wnt (Brennan y col., 1999, Curr. Biol. 9:707-710; Lawrence y col., 2001, Curr. Biol. 11:375-85).

[0013] Las células madre hematopoyéticas (HSC) son las células madre mejor entendidas en el cuerpo, y la señalización de Notch está implicada tanto en su mantenimiento normal, así como en la transformación leucémica (Kopper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73). Las HSC son una población rara de células que reside en un nicho del estroma dentro de la médula ósea adulta. Estas células se caracterizan tanto por un único perfil de expresión génica, además de por una capacidad para dar lugar continuamente a células progenitoras más diferenciadas para reconstituir el sistema hematopoyético completo. La activación constitutiva de la señalización de Notch1 en las HSC y células progenitoras establece líneas celulares inmortalizadas que generan tanto células linfoides como mieloides *in vitro* y en ensayos de reconstitución a largo plazo (Varnum-Finney y col., 2000, Nat. Med. 6:1278-81), y la presencia de Jagged1 aumenta el trasplante de poblaciones células de la médula ósea humana enriquecidas en las HSC (Karanu y col., 2000, J. Exp. Med. 192:1365-72). Más recientemente, se ha demostrado la señalización de Notch en HSC *in vivo* y se mostró que participaba en la inhibición de la diferenciación de HSC. Además, parece que la señalización de Notch se requiere para la auto-renovación de HSC mediada por Wnt (Duncan y col., 2005, Nat. Immunol. 6:314).

[0014] La ruta de la señalización de Notch también desempeña una función principal en el mantenimiento de las células madre neurales y está implicada tanto en su mantenimiento normal como en cánceres de cerebro (Kopper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73; Purow y col., 2005, Cancer Res 65:2353-63; Hallahan y col., 2004, Cancer Res 64:7794-800). Las células madre neurales dan lugar a todas células neuronales y de la glía en el sistema nervioso mamífero durante el desarrollo, y se han identificado más recientemente en el cerebro adulto (Gage, 2000, Science 287:1433-8). Ratones deficientes en Notch1; los genes diana Notch Hes1, 3 y 5; y un regulador de la señalización de Notch presenilina 1 (PS1) muestran números disminuidos de células madre neurales embrionarias. Además, las células madre neurales adultas se reducen en los cerebros de ratones heterocigóticos PS1 (Nakamura y col., 2000, J. Neurosci. 20:283-93; Hitoshi y col., 2002, Genes Dev. 16:846-58). La reducción en las células madre neurales parece resultar de su diferenciación prematura en neuronas (Hatakeyama y col., 2004, Dev. 131:5539-50) sugiriendo que la señalización de Notch regula la diferenciación de células madre neurales y la auto-renovación.

[0015] La señalización de Notch aberrante participa en varios cánceres humanos. El gen Notch1 en humanos se identificó por primera vez en un subgrupo de leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos T como un sitio translocado que produce la activación de la ruta de Notch (Ellisen y col., 1991, Cell 66:649-61). La activación constitutiva de la señalización de Notch1 en linfocitos T en modelos de ratón similarmente genera linfomas de linfocitos T que sugieren una función causante (Robey y col., 1996, Cell 87:483-92; Pear y col., 1996, J. Exp. Med. 183:2283-91; Yan y col., 2001, Blood 98:3793-9; Bellavia y col., 2000, EMBO J. 19:3337-48). Recientemente, se ha encontrado que las mutaciones puntuales, inserciones y deleciones de Notch1 que producen la señalización de Notch1 aberrante están frecuentemente presentes en leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T/linfoma tanto en niños como en adultos (Pear & Aster, 2004, Curr. Opin. Hematol. 11:416-33).

[0016] La frecuente inserción del virus de tumor mamario de ratón en ambos sitios Notch1 y Notch4 en tumores mamaros y los fragmentos de proteína Notch activados resultantes implicaron primero la señalización de Notch en cáncer de mama (Gallahan & Callahan, 1987, J. Virol. 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Politi y col., 2004, Semin. Cancer Biol. 14:341-7). Estudios adicionales en ratones transgénicos han confirmado una función para Notch en la ramificación de conductos durante el desarrollo normal de las glándulas

mamarias, y una forma constitutivamente activa de Notch4 en células epiteliales mamarias inhibe la diferenciación epitelial y produce tumorigénesis (Jhappan y col., 1992, *Genes & Dev.* 6:345-5; Gallahan y col., 1996, *Cancer Res.* 56:1775-85; Smith y col., 1995, *Cell Growth Differ* 6:563-77, Soriano y col., 2000, *Int. J. Cancer* 86:652-9, Uyttendaele y col., 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi y col., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Actualmente, la evidencia de una función para Notch en cáncer de mama humano está limitada a la expresión de receptores Notch en carcinomas de mama y su correlación con el resultado clínico (Weijzen y col., 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr y col., 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86). Además, se ha observado la expresión en exceso de la ruta de Notch en cánceres de cuello uterino (Zagouras y col., 1995, *PNAS* 92:6414-8), carcinomas de células renales (Rae y col., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32), carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Leethanakul y col., 2000, *Oncogene* 19:3220-4), cánceres del endometrio (Suzuki y col., 2000, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9) y neuroblastomas (van Limpt y col., 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8) lo que sugiere una posible función para Notch en el desarrollo de varios neoplasmas. De manera interesante, la señalización de Notch podría desempeñar una función en el mantenimiento del estado no diferenciado de células neoplásicas mutantes Apc del colon (van Es & Clevers, 2005, *Trends in Mol. Med.* 11:496-502).

15

[0017] La ruta de Notch también participa en múltiples aspectos del desarrollo vascular que incluyen proliferación, migración, diferenciación de músculo liso, angiogénesis y diferenciación arteriovenosa (Iso y col., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). Por ejemplo, las mutaciones nulas homocigóticas en Notch1/4 y Jagged1, así como la pérdida heterocigótica de DLL4, producen defectos de graves a variables en el desarrollo arterial y la vascularización del saco vitelino. Además, embriones de ratones deficientes en DLL1 e hipomórficos de Notch2 muestran hemorragia que probablemente resulta de un mal desarrollo de estructuras vasculares (Gale y col., 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs y col., 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue y col., 1999, *Hum. Mol. Genet* 8:723-30; Hrabe de Angelis y col., 1997, *Nature* 386:717-21; McCright y col., 2001, *Dev.* 123:491-502). En seres humanos, las mutaciones en Jagged1 están asociadas al síndrome de Alagille, un trastorno del desarrollo que incluye defectos vasculares, y las mutaciones en Notch3 son responsables de una demencia vascular hereditaria (Cadasil) en la que la homeostasis de los vasos es defectuosa (Joutel y col., 1996, *Nature* 383:707-10).

[0018] La identificación de Notch1, Notch4, DLL1 y DLL4 como genes expresados en células madre cancerígenas en comparación con el epitelio de mama normal sugiere que la elección como diana de la ruta de Notch puede ayudar a eliminar no solamente la mayor parte de las células cancerígenas no tumorigénicas, sino las células tumorigénicas responsables de la formación y reaparición de tumores sólidos. Además, debido a la importante función de la angiogénesis en la formación y el mantenimiento del tumor, la elección como diana de la ruta de Notch también puede inhibir eficazmente la angiogénesis, dejando morir a un cáncer de nutrientes y contribuyendo a su eliminación.

35

[0019] Se ha informado de anticuerpos anti-Notch y su posible uso como terapéuticos anticancerígenos. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. nº WO 2008/0131434 y 2009/0081238. Véanse también las publicaciones internacionales WO 2008/057144, WO 2008/076960 y WO 2008/50525. El documento WO 2007/145840 describe composiciones y procedimientos para diagnosticar y tratar cáncer. El documento WO 2004/094475 describe anticuerpos para factor tisular y usos de los mismos. El documento DE4425115 describe procedimientos para modificar la estabilidad de anticuerpos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0020] La invención se define por las reivindicaciones. Aquellos aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCION DE LA DIVULGACION

[0021] La presente divulgación proporciona agentes que se unen a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 y composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden estos agentes. La divulgación proporciona además procedimientos para elegir como diana células madre cancerígenas con los agentes. En algunos casos, los procedimientos comprenden reducir la frecuencia de células madre cancerígenas en un tumor, reducir el número de células madre cancerígenas en un tumor, reducir la tumorigenicidad de un tumor y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor reduciendo el número o frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor. La divulgación también proporciona procedimientos de uso de los agentes en el tratamiento de cáncer y/o en la inhibición del crecimiento tumoral.

[0022] En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la región

proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 (por ejemplo, Notch1 humano). En algunos casos, la región proximal de la membrana de unión no de ligando de un receptor Notch1 comprende aproximadamente del aminoácido 1427 a aproximadamente el aminoácido 1732 de un receptor Notch1 humano. En algunos casos, la región proximal de la membrana de un receptor Notch1 comprende SEQ ID N°: 2. En ciertos casos, el anticuerpo se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de al menos un miembro de la familia del receptor Notch adicional.

[0023] En algunos casos, el anticuerpo es un antagonista de Notch1. En algunos casos, el anticuerpo inhibe la señalización por o la activación del receptor Notch1. En algunos casos, el anticuerpo inhibe la actividad de Notch1.

10 En algunos casos, el anticuerpo inhibe la escisión dentro de la región proximal de la membrana. En ciertos casos, el anticuerpo inhibe la escisión del receptor Notch1 (por ejemplo, la escisión en el sitio S2 por una metaloproteasa) y/o inhibe la activación del receptor Notch1 por la unión del ligando. En algunos casos, el anticuerpo inhibe la liberación o formación del dominio intracelular (ICD) de Notch1. En ciertos casos, el anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral.

15 **[0024]** En ciertos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un Notch1 humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID N°: 15), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID N°: 16), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID N°: 17); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID N°: 18), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID N°: 19) y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID N°: 20). En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID N°: 15), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID N°: 16), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID N°: 17), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos. En ciertos otros casos, el anticuerpo comprende (o comprende además) una región variable de la cadena ligera que comprende: (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID N°: 18), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID N°: 19), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID N°: 20), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas.

35 **[0025]** En algunos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo, 52M51, producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, EE.UU., bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 7 agosto de 2008, y con el número de designación asignado PTA-9405. En algunos casos, la divulgación proporciona una versión humanizada del anticuerpo 52M51, 52M51H4L3, como se codifica por el ADN depositado con el ATCC, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008, y con el número de designación asignado PTA-9549. En algunos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo 52M51.

[0026] En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un Notch1 humano y el anticuerpo comprende, 45 consiste o consiste esencialmente en un anticuerpo "52R43" como se codifica por el ADN depositado en la ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008, y con el número de designación asignado PTA-9548. En algunos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con 52R43 por la unión específica a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un Notch1 humano. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden 52R43 y los procedimientos de 50 tratamiento de cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente eficaces del anticuerpo 52R43.

[0027] En ciertos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos descritos en los casos y/o aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos/casos descritos en cualquier lugar en el presente documento, para la unión específica a una región proximal de la 55 membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un Notch1 humano (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo). También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos descritos en el presente documento y procedimientos de tratamiento de cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente eficaces de los anticuerpos.

[0028] En ciertos casos de cada uno de los aspectos o casos anteriormente mencionados, así como otros aspectos y/o casos descritos en cualquier lugar en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En ciertos casos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En ciertos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es monovalente, monoespecífico, bivalente, biespecífico o multiespecífico. En ciertos casos, el anticuerpo está conjugado con un resto citotóxico. En ciertos casos, el anticuerpo está aislado. En aún casos adicionales, el anticuerpo es sustancialmente puro.

[0029] También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos descritos en el presente documento y los procedimientos de tratamiento de cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente eficaces de los anticuerpos descritos en el presente documento. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0030] En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido. En algunos casos, el polipéptido es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a Notch1), una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo, y/o un fragmento de un anticuerpo. En algunos casos, el polipéptido está aislado. En ciertos casos, el polipéptido es sustancialmente puro. En algunos casos, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32. En algunos casos, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 14 o SEQ ID N°: 24 y/o una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8, SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32. En algunos casos, el polipéptido comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14 o SEC ID NO: 24, y/o al menos una porción de la secuencia de aminoácido de SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32. Además, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden tanto el polipéptido como un vehículo farmacéuticamente aceptable, ya que son líneas celulares que producen el polipéptido.

[0031] En algunos casos, el polipéptido comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 14 o SEQ ID N°: 24; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32. En ciertos casos, el polipéptido es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a la región proximal de la membrana de unión no de ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano). En ciertos casos, el polipéptido comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32. En ciertos casos, el polipéptido comprende una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera del anticuerpo 52M51. En algunos casos, el polipéptido comprende una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo 52M51 humanizado. En algunos casos, el polipéptido comprende una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera del anticuerpo 52R43.

[0032] En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos y/o polipéptidos de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos/casos como se describe en el presente documento. En algunos casos, un vector de expresión comprende la molécula de polinucleótido. En otros casos, una célula huésped comprende el vector de expresión. En algunos casos, una célula huésped comprende la molécula de polinucleótido. En algunos casos, la célula huésped es una línea celular o una línea celular de hibridoma. En ciertos casos, la línea celular de hibridoma produce el anticuerpo 52M51 o el anticuerpo 52M51 humanizado.

[0033] En un aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento de inhibición de la actividad de Notch1 en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en los aspectos y casos anteriormente mencionados, así como otros aspectos/casos descritos en cualquier lugar en el presente documento. En ciertos casos, la célula es una célula tumoral.

[0034] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en los aspectos y casos anteriormente mencionados, así como otros aspectos/casos descritos en cualquier lugar en el presente documento. En algunos casos, el tumor comprende células madre cancerígenas. En algunos casos, los procedimientos comprenden elegir como diana las células madre cancerígenas con los anticuerpos. En ciertos casos, los procedimientos comprenden reducir la frecuencia de células

madre cancerígenas en un tumor, reduciendo el número de células madre cancerígenas en un tumor, reduciendo la tumorigenicidad de un tumor, y/o reduciendo la tumorigenicidad de un tumor reduciendo el número o frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor. En algunos casos, los procedimientos comprenden inhibir la actividad de un receptor Notch1 y/o inhibir el crecimiento de un tumor. En ciertos casos, el tumor se selecciona del grupo que
5 consiste en un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor hepático, tumor renal, tumor de pulmón, tumor pancreático, tumor ovárico, tumor de próstata y tumor de cabeza y cuello.

[0035] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos de tratamiento de cáncer en un sujeto. En algunos casos, el procedimiento comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz
10 de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en los aspectos y/o casos anteriormente mencionados, así como otros aspectos/casos descritos en cualquier lugar en el presente documento. En algunos casos, el cáncer que va a tratarse es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello. En ciertos casos de cada uno de los aspectos o
15 casos anteriormente mencionados, así como otros aspectos y/o casos descritos en cualquier lugar en el presente documento, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende inhibir el crecimiento tumoral.

[0036] En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz
20 de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano, en el que la unión inhibe la actividad de Notch1.

[0037] En un aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento de reducción de la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerígenas reduciendo la frecuencia o número de células madre
25 cancerígenas en el tumor, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el tumor con una cantidad eficaz de un anticuerpo que inhibe la actividad de Notch1.

[0038] En ciertos casos de cada uno de los aspectos y/o casos anteriormente mencionados, así como otros aspectos o casos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden además administrar al sujeto
30 al menos un agente anticancerígeno y/o terapéutico adicional. En ciertos casos de cada uno de los aspectos o casos anteriormente mencionados, así como otros aspectos y/o casos descritos en cualquier lugar en el presente documento, el anticuerpo o polipéptido se administra a un sujeto en combinación con un tratamiento adicional para el cáncer. En ciertos casos, el tratamiento adicional para el cáncer comprende radioterapia, quimioterapia y/o un terapéutico de anticuerpo adicional. En ciertos casos, la quimioterapia comprende taxol, irinotecan, gemcitabina y/
35 oxaliplatino. En ciertos casos, el terapéutico de anticuerpo adicional es un anticuerpo que se une específicamente a un segundo receptor Notch humano (por ejemplo, Notch2) o un ligando del receptor Notch humano (por ejemplo, DLL4 o JAG1). En ciertos casos, el terapéutico de anticuerpo adicional es un anticuerpo que se une específicamente a VEGF. En ciertos casos, el sujeto tratado es un ser humano.

[0039] La divulgación proporciona además un procedimiento de tratamiento de cáncer en un ser humano, en el que el cáncer que comprende células madre cancerígenas no se caracteriza por la expresión en exceso por la célula madre cancerígena de uno o más receptores Notch, que comprende administrar al ser humano una cantidad
40 terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 y bloquea la activación del ligando de un receptor Notch1.

[0040] La divulgación proporciona además un procedimiento de tratamiento de cáncer en un ser humano que comprende administrar al ser humano cantidades terapéuticamente eficaces de (a) un primer anticuerpo que se une a un receptor Notch1 e inhibe el crecimiento de las células madre cancerígenas que expresan en exceso los
45 receptores Notch, y (b) un segundo anticuerpo que se une a un receptor Notch y bloquea la activación del ligando de un receptor Notch.

[0041] La divulgación también proporciona otro procedimiento de tratamiento de cáncer, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, colon, pancreático, de próstata, de pulmón, rectal y colorrectal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que bloquea la
50 activación del ligando de un receptor Notch1.

[0042] La divulgación proporciona adicionalmente: un anticuerpo humanizado que se une a Notch1 y bloquea la activación del ligando de un receptor Notch1; una composición que comprende el anticuerpo humanizado y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo humanizado conjugado

con un agente citotóxico.

- [0043]** Además, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo humanizado; un vector que comprende el ácido nucleico; una célula huésped que comprende el ácido nucleico o el vector; así como un procedimiento de producción del anticuerpo humanizado que comprende cultivar una célula huésped que comprende el ácido nucleico de tal forma que el ácido nucleico se expresa y, opcionalmente, comprende además recuperar el anticuerpo humanizado del cultivo de la célula huésped (por ejemplo, del medio de cultivo de la célula huésped).
- 10 **[0044]** La divulgación se refiere además a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a Notch conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina, y al uso de tales conjugados para tratar cáncer que expresa Notch, por ejemplo, un cáncer en el que las células madre cancerígenas expresan en exceso Notch.

- [0045]** Ejemplos de tumores sólidos que pueden tratarse usando una composición terapéutica de la presente memoria descriptiva, por ejemplo, un anticuerpo que se une a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

- [0046]** Si los aspectos o casos de la divulgación se describen en términos de un grupo de Markush u otra agrupación de alternativas, la presente divulgación engloba no solo el grupo entero enumerado como un todo, sino también cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, y también el grupo principal en el que están ausentes uno o más de los miembros del grupo. La presente divulgación también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la divulgación reivindicada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35

[0047]

Figura 1: Identificación de anticuerpos que eligen como diana la región proximal de la membrana de Notch que inhiben la señalización de Notch.

40

- (A): Esquema del receptor Notch y la región del antígeno 52M. El antígeno 52M incluye el área del receptor Notch1 sujeto a escisión por furina durante la maduración del receptor y escisión por las proteasas ADAM (una desintegrina y metaloproteasa) tras la unión del ligando. El procesamiento posterior por gamma-secretasa provoca la liberación del dominio intracelular (ICD) de Notch que activa la transcripción del gen en el núcleo. (B): Niveles de luciferasa (eje y) derivados de Notch1-células Hela cultivadas en presencia de un ligando Notch soluble (hDLL4-fc) y anticuerpos del receptor Notch1. Los resultados de las células no transfectadas (NT) con y sin hDLL4-Fc se muestran a la izquierda del eje x. Los anticuerpos del receptor Notch1 52M se muestran a lo largo del eje x y se comparan con DBZ, un inhibidor de gamma-secretasa de Notch (GSI), y 21M18, un anticuerpo anti-DLL4. Los anticuerpos del receptor Notch1 52M51, 52M63, 52M74 y 52M80 inhiben todos significativamente la señalización de Notch como se indica por una disminución en la actividad de luciferasa. (C): Los niveles de luciferasa (eje y) se derivan de Notch1-células Hela cultivadas en presencia de un ligando Notch soluble (hDLL4-fc) y anticuerpos del receptor Notch1. Los resultados de las células no transfectadas (NT) con y sin hDLL4-Fc se muestran a la izquierda del eje x. Se muestran el anticuerpo derivado del hibridoma murino 52M51 y la variante humanizada 52M51-H4/L3 a lo largo del eje x en varias concentraciones como se indica. Tanto el anticuerpo murino parental 52M51 como la variante humanizada inhibieron significativamente la señalización de Notch como se indica por una disminución en la actividad de luciferasa. (D): Análisis de transferencia Western de la formación ICD después de la estimulación mediada por el ligando de Notch que expresa células Hela. Se produce el ICD mínimo en ausencia del ligando DLL4 (-DLL4), pero la formación se estimula por la presencia de DLL4. Los anticuerpos 52M51, 52M63, 52M74 y 52M80 reducen la formación de ICD a niveles de referencia a pesar de la presencia de DLL4.

55

Figura 2: El anticuerpo del receptor Notch1 52M51 inhibe la formación tumoral *in vivo*

(A) Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de colon C8 se trataron con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 52M51 anti-Notch1 (triángulos), y se midió el volumen tumoral (eje y, mm³) con el tiempo (eje x, días). El tratamiento con los anticuerpos 52M51 (p=0,0006) inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control. (B): Mediciones del volumen tumoral individual de animales en (A) medidas en los días 48 y 55 para control (izquierda) frente a ratones tratados con 52M51 (derecha). Una línea delimita el promedio de cada grupo experimental. (C): Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de mama PE13 se trataron con anticuerpo de control (cuadrados negros) o anticuerpos anti-Notch1 que no inhiben la señalización de Notch como se muestra en la Figura 1B: 52M1 (triángulos negros) y 52M2 (círculos grises). El volumen tumoral (eje y, mm³) se midió con el tiempo (eje x, días). El tratamiento con 52M1 y 52M2 dejó de afectar el crecimiento tumoral cuando se comparó con animales tratados con control. (D): Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de mama PE13 se trataron con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 52M8 anti-Notch1 (triángulos) que no inhiben la señalización de Notch como se muestra en la Figura 1B. El volumen tumoral (eje y, mm³) se midió con el tiempo (eje x, días). El tratamiento con 52M8 dejó de afectar el crecimiento tumoral cuando se comparó con animales tratados con control.

Figuras 3: El anticuerpo del receptor anti-Notch1 52R43 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*

(A): Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de melanoma M2 se trataron con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 52R43 anti-Notch1 (círculos), y se midió el volumen tumoral (eje y, mm³) con el tiempo (eje x, días). (B): Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de pulmón Lu24 se trataron con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 52R43 anti-Notch1 (círculos), y se midió el volumen tumoral (eje y, mm³) con el tiempo (eje x, días). (C): Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor pancreático PN8 se trataron con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 52R43 anti-Notch1 (círculos) y se midió el volumen tumoral (eje y, mm³) con el tiempo (eje x, días). (D): Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de mama T1 se trataron con anticuerpo de control (cuadros) y anticuerpo 52R43 anti-Notch1 (círculos rellenos), taxol (triángulos) o 52R43 y taxol (círculos blancos) y se midió el volumen tumoral (eje y, mm³) con el tiempo (eje x, días).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

[0048] La presente divulgación proporciona agentes novedosos, que incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos tales como anticuerpos, que se unen a uno o más receptores Notch humanos. Los agentes de unión a Notch incluyen antagonistas del (de los) receptor(es) Notch humano(s). También se proporcionan polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes de unión a Notch y procedimientos de preparación de los agentes de unión a Notch. Además, se proporcionan procedimientos de uso de los nuevos agentes de unión a Notch, tales como los procedimientos de inhibición del crecimiento tumoral y/o tratamiento de cáncer.

[0049] La presente divulgación identifica además moléculas (por ejemplo, anticuerpos) que se unen específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*. La región de unión del ligando de Notch, que es necesaria y suficiente para la unión del ligando, se ha identificado como las repeticiones EGF 11 y 12, que sugiere que esta región del receptor Notch es importante en la señalización de Notch y tumorigénesis (Rebay y col., 1991, Cell 67:687; Lei y col., 2003, Dev. 130:6411; Hambleton y col., 2004, Structure 12:2173). Inesperadamente, se ha encontrado que los anticuerpos que se unen fuera del dominio de unión del ligando del dominio extracelular del receptor Notch humano inhiben el crecimiento de células tumorales *in vivo* (véase la publicación de Patente de EE.UU. nº 2008/0131434). Así, los anticuerpos que se unen fuera del dominio de unión del ligando del dominio extracelular de uno o más de los receptores Notch humanos, Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4, tienen valor como posibles terapéuticos para el cáncer.

[0050] Ahora se han identificado anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la región proximal de la membrana del dominio extracelular de un Notch1, incluyendo el anticuerpo monoclonal 52M51 (Ejemplo 1). También se han generado anticuerpos 52M51 humanizados (Ejemplo 2). Varios de los anticuerpos, incluyendo 52M51, y una variante humanizada de 52M51, inhiben la señalización de Notch1 inducida por el ligando (Ejemplo 3 y Figura 1B y 1C), a pesar de la unión de Notch1 en una región fuera de la región de unión del ligando. También se ha demostrado la capacidad de varios de los anticuerpos para inhibir la formación del dominio intracelular Notch (ICD) (Ejemplo 3 y Figura 1D). Se ha encontrado que 52M51 inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo* en un

modelo de xenoinjerto (Ejemplo 5 y Figura 2A y 2B). Además, se ha encontrado que otro anticuerpo 52R43 inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo* en múltiples modelos de xenoinjerto (Ejemplo 7 y Figuras 3A-3D).

Definiciones

5 **[0051]** Un “antagonista” de un receptor Notch como se usa en el presente documento es un término que incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcialmente o completamente una actividad biológica de la ruta de Notch. Moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpos. El término “antagonista” se usa en el presente documento para incluir cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcialmente o completamente la expresión de un receptor Notch.

10 **[0052]** El término “anticuerpo” se usa para significar una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, hidrato de carbono, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores, etc., por al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término engloba anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos monovalentes o mono-específicos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno mientras que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, o sus subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

20 **[0053]** Como se usa en el presente documento, el término “fragmento de anticuerpo” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

30 **[0054]** Un “anticuerpo Fv” se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión del antígeno completo ya sea como dos cadenas, en el que un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera forman un dímero no covalente, o como una cadena individual (scFv), en el que el dominio variable de la cadena pesada y la cadena ligera están covalentemente ligados por un conector peptídico flexible de tal forma que las dos cadenas se asocian en una estructura dimerica similar. En esta configuración, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir la especificidad de unión del antígeno del dímero Fv. Alternativamente, puede usarse un dominio variable individual (o la mitad de un Fv) para reconocer y unir el antígeno, aunque generalmente con menor afinidad.

40 **[0055]** Un “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a una población de anticuerpos homogénea que participa en el reconocimiento altamente específico y la unión de un determinante antigénico individual, o epítipo. Esto es a diferencia de los anticuerpos policlonales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes antigénicos diferentes. El término “anticuerpo monoclonal” engloba tanto anticuerpos monoclonales intactos de longitud completa como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes monocatenarios (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción del anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno. Además, “anticuerpo monoclonal” se refiere a tales anticuerpos preparados en cualquier número de maneras que incluyen, pero no se limitan a, por hibridoma, selección de fago, expresión recombinante y animales transgénicos.

50 **[0056]** Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o sus fragmentos que contienen secuencias no humanas mínimas. Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están sustituidos con residuos de una CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tienen la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada. En algunos casos, los

residuos de la región estructural de Fv (FR) de una inmunoglobulina humana están sustituidos con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada. El anticuerpo humanizado puede modificarse además por la sustitución de residuos adicionales en cualquiera de la región estructural Fv y/o dentro de los residuos no humanos sustituidos para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR que se corresponden con la inmunoglobulina no humana mientras que todas, o sustancialmente todas, las regiones FR, son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de procedimientos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la patente de EE.UU. nº 5.225.539.

[0057] Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, tanto sola como en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones estructurales (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencias de especies cruzadas (es decir, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo (Al-lazikani y col., 1997, *J. Molec. Biol.* 273:927-948). Además, las combinaciones de estos dos enfoques se usan algunas veces en la técnica para determinar las CDR.

[0058] El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que se corresponde con un anticuerpo producido por un ser humano preparado usando cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, sus fragmentos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de la cadena ligera murina y cadena pesada humana.

[0059] El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Normalmente, la región variable de tanto las cadenas ligeras como pesadas se corresponde con la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otras especies (normalmente humanos) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esas especies. El término anticuerpo quimérico incluye anticuerpos monovalentes, divalentes, y polivalentes.

[0060] El término "epítoto" o "determinante antigénico" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a esa porción de un antígeno capaz de ser reconocida y unirse específicamente por un anticuerpo particular. Si el antígeno es un polipéptido, pueden formarse epítotos tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por un pliegue terciario de una proteína. Los epítotos formados de aminoácidos contiguos (también denominados epítotos lineales) normalmente se retienen tras la desnaturalización de una proteína, mientras que los epítotos formados por el pliegue terciario (también denominados epítotos conformacionales) normalmente se pierden tras la desnaturalización de la proteína. Un epítoto incluye normalmente al menos 3, y más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

[0061] Que un anticuerpo "se una selectivamente" o "se una específicamente" a un epítoto o receptor significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de los anteriores, al epítoto o receptor que con sustancias alternativas, que incluye proteínas no relacionadas. "Se une selectivamente" o "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con un K_D de aproximadamente 0,1 mM o menos, a veces aproximadamente 1 μ M o menos, a veces aproximadamente 0,1 μ M o menos y a veces aproximadamente 0,01 μ M o menos. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en especies diferentes, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce un receptor Notch en más de una especie. Se entiende que, en ciertos casos, un anticuerpo o resto de unión que se une específicamente a una primera diana puede o no puede unirse específicamente a una segunda diana. Es decir, la "unión específica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva, es decir, la unión a una única diana. Generalmente, pero no necesariamente, referencia a

unión significa unión específica.

[0062] La competencia entre los anticuerpos se determina por un ensayo en el que la inmunoglobulina en estudio inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitivos, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competencia tipo sándwich (véase Stahli y col., *Methods in Enzymology* 9:242-253 (1983)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland y col., *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida solida, ensayo tipo sándwich marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA con marca directa en fase sólida usando marca de ¹²⁵I (véase Morel y col., *Molec. Immunol.* 25(1):7-15 (1988)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung y col., *Virology* 176:546-552 (1990)); y RIA marcado directo (Moldenhauer y col., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990)). Normalmente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide por la determinación de la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competencia (anticuerpos de competencia) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítotope que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítotope adyacente lo suficientemente próximo al epítotope unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca el impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo de competencia está presente en exceso, inhibirá al menos el 50 o el 75 % la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común.

[0063] Los términos "aislado" o "purificado" se refieren al material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y homogeneidad normalmente se determinan usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poli(acrilamida) o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, en algunos casos, un ácido nucleico aislado que comprende un gen se separa de marcos de lectura abiertos que naturalmente flanquean el gen y codifican proteínas diferentes de la proteína codificada por el gen. Un anticuerpo aislado se separa de otras proteínas de no inmunoglobulina y de otras proteínas de inmunoglobulina con diferentes especificidades de unión de antígeno. También pueden significar que el ácido nucleico o proteína son al menos el 85 % puros, al menos el 95 % puros y, en algunos casos, al menos el 99 % puros.

[0064] Como se usa en el presente documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos en la que una población de células se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

[0065] "Tumor" y "neoplasma", como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier masa de tejido que resulta de un crecimiento o proliferación celular excesiva, tanto benigno (no canceroso) como maligno (canceroso), incluyendo lesiones pre-cancerígenas.

[0066] Los términos "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa" se refieren a trastornos asociados a la proliferación de células anormales tal como el cáncer.

[0067] "Metástasis", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso por el cual un cáncer se extiende o se transfiere desde el sitio de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerígena similar en la nueva localización. Una célula "metastásica" o "metastatizante" es una que pierde contactos adhesivos con las células vecinas y migra mediante la corriente sanguínea o linfa del sitio primario de enfermedad para invadir estructuras del cuerpo vecinas.

[0068] Los términos "célula madre cancerígena" o "célula madre de tumor" o "célula madre de tumor sólido" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a una población de células de un tumor sólido que:

- (1) tiene una extensa capacidad proliferativa; (2) son capaces de división celular asimétrica para generar una o más tipos de progenie diferenciada con un potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para la auto-renovación o auto-mantenimiento. Estas propiedades de las “células madre cancerígenas” o “células madre de tumor” o “células madre de tumor sólidas” confieren a las células madre cancerígenas la capacidad de formar tumores palpables tras el trasplante en serie en un ratón inmunodeprimido en comparación con la mayor parte de las células tumorales que dejan de formar tumores. Las células madre cancerígenas experimentan auto-renovación frente a la diferenciación de una manera caótica para formar tumores con tipos de células anormales que pueden cambiar con el tiempo a medida que se producen las mutaciones.
- 5 **[0069]** Los términos “célula cancerígena” o “célula tumoral” se refieren a la población total de células derivadas de un tumor que incluyen tanto células no tumorigénicas, que comprenden la masa de la población celular tumoral, como células madre tumorigénicas (células madre cancerígenas).
- [0070]** Como se usa en el presente documento, “tumorigénico” se refiere a los aspectos funcionales de una
 15 célula madre de tumor sólido que incluyen las propiedades de auto-renovación (que dan lugar a células madre cancerígenas tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar todas las otras células tumorales (que dan lugar a células tumorales diferenciadas y de esta forma no tumorigénicas) que permiten que las células madre de tumor sólido formen un tumor.
- 20 **[0071]** Como se usa en el presente documento, la “tumorigenicidad” de un tumor se refiere a la capacidad de una muestra aleatoria de células del tumor para formar tumores palpables tras el trasplante en serie en ratones inmunodeprimidos.
- [0072]** Como se usa en el presente documento, los términos “marcador de cáncer de células madre” o
 25 “marcador de células madre de cáncer” o “marcador de células madre de tumor” o “marcador de células madre de tumor sólido” se refieren a un gen o genes o a una proteína, polipéptido o péptido expresado por el gen o genes cuyo nivel de expresión, solo o en combinación con otros genes, está correlacionado con la presencia de células cancerígenas tumorigénicas en comparación con células no tumorigénicas. La correlación puede referirse a tanto un aumento o disminución de la expresión del gen (por ejemplo, aumento o disminución de los niveles de ARNm o el
 30 péptido codificado por el gen).
- [0073]** Los términos “firma génica de células madre cancerígenas” o “firma génica de células madre de tumor” o “firma de células madre de cáncer” se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a firmas génicas que comprenden genes diferencialmente expresados en células madre cancerígenas en comparación con
 35 otras células o poblaciones de células, por ejemplo, tejido epitelial de mama normal. En algunos casos, las firmas génicas de células madre cancerígenas comprenden genes diferencialmente expresados en células madre cancerígenas contra epitelio de mama normal por un cambio de veces, por ejemplo, expresión dos veces reducida y/o elevada, y además limitado por el uso de un análisis estadístico tal como, por ejemplo, por el valor P de una prueba de la t a través de múltiples muestras. En otra realización, los genes diferencialmente expresados en células
 40 madre cancerígenas se dividen en firmas génicas de células madre cancerígenas basadas en la correlación de su expresión con un gen elegido en combinación con su veces de cambio de la expresión o porcentaje. Las firmas de células madre cancerígenas son pronosticables tanto retrospectivamente como prospectivamente de un aspecto de variabilidad clínica, que incluye, pero no se limita a, a metástasis y muerte.
- 45 **[0074]** El término “prueba genética”, como se usa en el presente documento, se refiere a procedimientos por los cuales se analiza la formación genética de un paciente o una muestra de tumor de paciente. El análisis puede incluir la detección de ADN, ARN, cromosomas, proteínas o metabolitos para detectar genotipos o cariotipos relacionados con la enfermedad hereditarios o somáticos para fines clínicos.
- 50 **[0075]** Como se usa en el presente documento, los términos “biopsia” o “tejido de biopsia” se refieren a una muestra de tejido o líquido que se extrae de un sujeto con el fin de determinar si la muestra contiene tejido cancerígeno. En algunos casos, el tejido de la biopsia o el líquido se obtienen debido a que se sospecha que el sujeto tiene cáncer. El tejido o líquido de la biopsia se examina después para la presencia o ausencia de cáncer.
- 55 **[0076]** Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento particular. Normalmente, los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en el presente documento con referencia a un sujeto humano.

[0077] “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a autorizado o autorizable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, incluyendo seres humanos.

5 **[0078]** “Excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable” o “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente, vehículo o adyuvante que puede administrarse a un sujeto, junto con al menos un anticuerpo de la presente divulgación, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para suministrar una cantidad terapéutica del anticuerpo. Además, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” no desencadena una respuesta inmunitaria en un sujeto receptor. Ejemplos
10 incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, y diversas emulsiones de aceite/agua. Algunos diluyentes para administración por aerosol o parenteral son solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0,9 %).

[0079] “Vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra al menos un anticuerpo de la presente divulgación.
15

[0080] El término “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” o “efecto terapéutico” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco tiene un efecto terapéutico y como tal puede reducir el número de células cancerígenas; disminuir la tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica; reducir el número o frecuencia de células madre cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos que incluyen, por ejemplo, la dispersión del cáncer en tejido blando y hueso; inhibir y detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento tumoral; aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados al cáncer; reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de tales efectos. Hasta el punto que el agente, por ejemplo un anticuerpo, previene el crecimiento y/o aniquila las células cancerígenas existentes, puede denominarse citostático y/o citotóxico.
20
25

[0081] Términos tales como “tratando” o “tratamiento” o “para tratar” o “aliviar” o “para aliviar” se refieren a tanto 1) mediciones terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen síntomas de, y/o detienen la progresión de una afección patológica diagnosticada o trastorno como 2) mediciones profilácticas o preventivas que previenen o ralentizan el desarrollo de una afección patológica o trastorno elegido como diana. Así, aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. Un sujeto es satisfactoriamente “tratado” según los procedimientos de la presente divulgación si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número de o ausencia completa de células cancerígenas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o ausencia de infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos que incluyen la propagación del cáncer a tejido blando y hueso; inhibición de o ausencia de metástasis de tumor; inhibición o ausencia de crecimiento de tumor; alivio de uno o más síntomas asociados al cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducida; mejora en la calidad de vida; reducción en la tumorigenicidad; reducción en el número o frecuencia de células madre cancerígenas; o alguna combinación de los efectos.
30
35
40

[0082] Como se usa en el presente documento, los términos “polinucleótido” o “ácido nucleico” se refieren a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótido (ribonucleótido o desoxirribonucleótido o variantes estructurales relacionadas) ligadas por enlaces fosfodiéster que incluyen, pero no se limitan a, ADN o ARN. El término engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN.
45

[0083] El término “gen” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede codificarse por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante mientras que se retengan las actividades deseadas o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión de ligando, transducción de señales, inmunogenicidad, etc.) del polipéptido o fragmento de longitud completa. El término también engloba la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en tanto los extremos 5' como 3' durante la distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo de tal forma que el gen se corresponda con la longitud del ARNm de longitud completa. El término “gen” engloba tanto ADNc como formas genómicas de un gen.
50
55

[0084] El término “recombinante”, cuando se usa con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado por la introducción de un ácido

nucleico heterólogo o proteína, la alteración de un ácido nucleico nativo o proteína, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan en exceso o por el contrario se expresan anormalmente tales como, por ejemplo, se expresan como fragmentos que se producen no naturalmente o variantes de corte y empalme. Por el término “ácido nucleico recombinante” se indica en el presente documento ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, por la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma no normalmente encontrada en la naturaleza. De forma, se logra el enlace operable de diferentes secuencias. Así, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN de que normalmente no están unidas, se consideran ambos recombinantes para los fines de esta divulgación. Se entiende que una vez se prepara un ácido nucleico recombinante y se introduce en una célula huésped u organismo, se replicará no recombinantemente, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos recombinantemente, aunque se repliquen posteriormente no recombinantemente, todavía se consideran recombinantes para los fines de la divulgación. Similarmente, una “proteína recombinante” es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante como se describe anteriormente.

[0085] Como se usa en el presente documento, el término “vector” se usa en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmento(s) de ADN de una célula a otra. Los vectores se derivan generalmente de plásmidos, bacteriófagos o virus de plantas o animales.

[0086] Como se usa en el presente documento, el término “expresión génica” se refiere al proceso de convertir la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNnp) mediante la “transcripción” del gen (por ejemplo, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa), y para genes que codifican proteína, en proteína mediante “traducción” de ARNm. La expresión génica puede regularse en muchas etapas en el proceso. “Regulación ascendente” o “activación” se refiere a la regulación que aumenta la producción de productos de expresión génica (por ejemplo, ARN o proteína), mientras que “regulación descendente” o “represión” se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que participan en la regulación ascendente o la regulación descendente frecuentemente se llaman “activadores” y “represores”, respectivamente.

[0087] Los términos “polipéptido” o “péptido” o “proteína” o “fragmento de proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido que se produce naturalmente correspondiente, además de polímeros de aminoácidos que se producen naturalmente y polímeros de aminoácidos que no se producen naturalmente.

[0088] El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos que se producen naturalmente y sintéticos, además de a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan similarmente a los aminoácidos que se producen naturalmente. Los aminoácidos que se producen naturalmente son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosforoserina. “Análogos de aminoácido” se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce naturalmente, por ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R (por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos de péptido modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce naturalmente. “Miméticos de aminoácido” se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona similarmente a un aminoácido que se produce naturalmente.

[0089] “Variantes conservativamente modificadas” se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. “Variantes de aminoácido” se refiere a secuencias de aminoácidos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, variantes conservativamente modificadas se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas (por ejemplo, naturalmente contiguas). Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayor parte de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede alterarse a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales

variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Se reconoce que en ciertos contextos cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es generalmente el único codón para metionina, y TGG, que es generalmente el único codón para triptófano) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda actuales.

[0090] En cuanto a las secuencias de aminoácido, se reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o proteínas que altera, añade o delecciona un aminoácido individual o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante conservativamente modificada” que incluye si la alteración produce la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de las sustituciones conservativas proporcionan aminoácidos funcionalmente similares que son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Tabla 1). Orientación referente a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos también pueden encontrarse en Bowie y col., 1990, Science 247:1306 1310. Tales variantes conservativamente modificadas son además de y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la divulgación. Las sustituciones normalmente conservativas incluyen: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Acido aspártico (D), Acido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K), 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)). Como se indica, los cambios son normalmente de una naturaleza menor, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas que no afectan significativamente el pliegue o la actividad de la proteína.

Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos conservativas

Aminoácido original	Sustituciones conservativas a modo de ejemplo
Alanina	Valina, isoleucina, leucina, glicina, serina
Arginina	Lisina, histidina, glutamina, asparagina
Asparagina	Glutamina, histidina, lisina, arginina
Acido aspártico	Acido glutámico, asparagina
Cisteína	Serina, alanina, metionina
Glutamina	Asparagina
Acido glutámico	Acido aspártico, glutamina
Glicina	Prolina, alanina
Histidina	Asparagina, glutamina, lisina, arginina
Isoleucina	Leucina, valina, metionina, alanina, fenilalanina, norleucina
Leucina	Norleucina, isoleucina, valina, metionina, alanina, fenilalanina
Lisina	Arginina, glutamina, asparagina, histidina
Metionina	Leucina, fenilalanina, isoleucina, valina, cisteína
Fenilalanina	Leucina, valina, isoleucina, alanina, tirosina
Prolina	Alanina, glicina
Serina	Treonina
Treonina	Serina
Triptófano	Tirosina, fenilalanina
Tirosina	Triptófano, fenilalanina, treonina, serina
Valina	Isoleucina, metionina, leucina, fenilalanina, alanina, norleucina

[0091] Como se usa en la presente divulgación y las reivindicaciones, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen formas en plural, a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

[0092] Se entiende que cada vez que se describen en el presente documento casos con el lenguaje “que comprende”, también se proporcionan casos de otra forma análogos descritos en términos de “consiste en” y/o “consiste esencialmente en”.

Ciertos casos de la presente divulgación

[0093] La presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para estudiar, diagnosticar,

caracterizar y tratar cáncer. En particular, en ciertos casos, la presente divulgación proporciona agentes, que incluyen antagonistas, que se unen a receptores Notch y procedimientos de uso de los agentes o antagonistas para inhibir el crecimiento tumoral y tratar cáncer u otras enfermedades en pacientes humanos. En ciertos casos, los antagonistas son anticuerpos que se unen específicamente a una región de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano.

[0094] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región de Notch1 humano que comprende aproximadamente el aminoácido 1427 a aproximadamente el aminoácido 1732. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región que comprende SEQ ID N°: 2. En ciertos casos, el anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de al menos un receptor Notch adicional.

[0095] En algunos casos, el anticuerpo es un antagonista de Notch1 humano. En ciertos casos, el anticuerpo inhibe la señalización inducida por el ligando de una ruta de Notch1. En algunos casos, el anticuerpo inhibe la actividad de Notch1. En otros casos, el anticuerpo inhibe la escisión de un receptor Notch1. En algunos casos, el anticuerpo inhibe la escisión de Notch1 en un sitio dentro de la región proximal de la membrana del dominio extracelular. En ciertos casos, el anticuerpo inhibe la liberación o formación del dominio intracelular (ICD) de Notch1. En otros casos, el anticuerpo reduce la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerígenas. En ciertos casos, el anticuerpo inhibe el crecimiento de un tumor que comprende células madre cancerígenas. En ciertos casos, el anticuerpo inhibe el crecimiento de un tumor.

[0096] En ciertos casos, el anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral es un anticuerpo monoclonal. En ciertos casos, el anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano es un anticuerpo quimérico, es un anticuerpo humanizado, es un anticuerpo humano, es un fragmento de anticuerpo o es un anticuerpo biespecífico. En ciertos casos, la presente divulgación proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral.

[0097] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de una proteína del receptor Notch1 humano. En algunos casos, el tumor comprende células madre cancerígenas. En algunos casos, los procedimientos comprenden elegir como diana las células madre cancerígenas con los anticuerpos. En ciertos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal. En ciertos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo quimérico. En ciertos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado. En ciertos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humano.

[0098] En ciertos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor comprende reducir la frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor, reducir el número de células madre cancerígenas en el tumor, reducir la tumorigenicidad del tumor, y/o reducir la tumorigenicidad del tumor reduciendo el número o frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor. En algunos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un tumor comprende inhibir la actividad de un receptor Notch1. En ciertos casos, el tumor incluye, pero no se limita a, tumor de mama, tumor colorrectal, tumor hepático, tumor renal, tumor de pulmón, tumor pancreático, tumor ovárico, tumor de próstata y tumor de cabeza y cuello.

[0099] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de una proteína del receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral en el sujeto. En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal. En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo quimérico. En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de

cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado. En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humano.

5 **[0100]** En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo conjugado con un resto citotóxico que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral. En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de cualquiera de los aspectos y/o casos, así como otros
10 aspectos y/o casos descritos en el presente documento, en combinación con radioterapia. En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de cualquiera de los aspectos y/o casos, así como otros aspectos y/o casos descritos en el presente documento, en combinación con quimioterapia. En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer
15 comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral que son de tumores que incluyen, pero no se limitan a, un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de pulmón, tumor pancreático, tumor de próstata, o un tumor de cabeza y cuello.

[0101] En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende identificar pacientes en
20 necesidad de tratamiento usando una prueba genética que comprende un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo a los pacientes. En ciertos casos, el procedimiento de tratamiento de cáncer comprende identificar pacientes en necesidad de tratamiento con un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un
25 receptor Notch1 humano usando una prueba genética que detecta una firma de células madre cancerígenas, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral.

30 **[0102]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de identificación de una molécula que se une a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral, comprendiendo el procedimiento: i) incubar la molécula con una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano; ii) determinar si la molécula se une a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio
35 extracelular de un receptor Notch1 humano; y iii) determinar si la molécula inhibe el crecimiento tumoral. En ciertos casos, la divulgación proporciona un procedimiento de identificación de una molécula que se une a una región proximal de la membrana de unión no de ligando de un dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral, comprendiendo el procedimiento: i) incubar la molécula con la región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano que comprende SEQ ID
40 N°: 2; ii) determinar si la molécula se une a la región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano que comprende SEQ ID N°:2; y iii) determinar si la molécula inhibe el crecimiento tumoral.

[0103] En ciertos casos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende
45 un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral.

[0104] En ciertos casos, la presente divulgación proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio
50 extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral.

[0105] En ciertos casos, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral.

55 **[0106]** En ciertos casos, los antagonistas contra un receptor Notch, tal como Notch1, actúan extracelularmente para actuar sobre o inhibir la función del receptor Notch. En ciertos casos, un antagonista de un receptor Notch es proteínico. En algunos casos, antagonistas proteínicos de un receptor Notch1 son anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo extracelular de un receptor Notch1. La unión extracelular de un antagonista contra un

receptor Notch1 puede inhibir la señalización de un receptor Notch inhibiendo la activación intrínseca (por ejemplo, actividad de cinasa) de un receptor Notch1 y/o inhibiendo estéricamente la interacción, por ejemplo, de un receptor Notch con uno de sus ligandos. Además, la unión extracelular de un antagonista a un receptor Notch puede regular por disminución la expresión de la superficie celular de un receptor Notch tal como, por ejemplo, por internalización de un receptor Notch y/o disminuyendo el tráfico de la superficie celular de un receptor Notch. La unión extracelular de un antagonista a un receptor Notch puede inhibir la escisión del receptor Notch y reducir la liberación del ICD de Notch.

[0107] En algunos casos, los antagonistas contra un receptor Notch se unen a un receptor Notch y tienen uno o más de los siguientes efectos: inhibir la proliferación de las células tumorales, desencadenar la muerte celular directamente en células tumorales, o prevenir la metástasis de células tumorales. En ciertos casos, los antagonistas de un receptor Notch desencadenan la muerte celular mediante una toxina conjugada, agente quimioterapéutico, radioisótopo u otro agente tal. Por ejemplo, un anticuerpo contra un receptor Notch se conjuga con una toxina que se activa en células tumorales que expresan el receptor Notch por internalización de proteínas. En otros casos, los antagonistas de un receptor Notch median en la muerte celular de una célula que expresa el receptor Notch mediante citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). La ADCC implica la lisis celular por células efectoras que reconocen la porción Fc de un anticuerpo. Muchos linfocitos, monocitos, macrófagos tisulares, granulocitos y eosinófilos, por ejemplo, tienen receptores de Fc y pueden mediar en la citólisis (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497). En algunos casos, un antagonista de un receptor Notch es un anticuerpo que desencadena la muerte celular de la célula que expresa un receptor Notch activando la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La CDC implica la unión del complemento sérico a la porción Fc de un anticuerpo y la posterior activación de la cascada de proteínas del complemento, produciendo un daño en la membrana celular y eventualmente la muerte celular. Se sabe que la actividad biológica de los anticuerpos se determina, en gran medida, por los dominios constantes o la región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananue y Benacerraf, Textbook of Immunology, 2ª edición, Williams & Wilkins, pág. 218 (1984)). Los anticuerpos de diferentes clases y subclases difieren en este respecto, como lo hacen los anticuerpos de la misma subclase pero de diferentes especies. De los anticuerpos humanos, IgM es la clase más eficaz de anticuerpos para unirse al complemento, seguido por IgG1, IgG3 y IgG2 en el que IgG4 parece bastante deficiente en la activación de la cascada del complemento (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Jefferis y col., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). Según la presente divulgación, se preparan anticuerpos de aquellas clases que tienen la actividad biológica deseada.

[0108] Puede ensayarse capacidad de cualquier anticuerpo particular contra un receptor Notch para mediar en la lisis de la célula diana por la activación del complemento y/o ADCC. Las células de interés se cultivan y se marcan *in vitro*; el anticuerpo se añade al cultivo celular en combinación con tanto células del complemento sérico como inmunitarias que pueden activarse por los complejos de antígeno-anticuerpo. La citólisis de las células diana se detecta, por ejemplo, por la liberación de la marca de las células lisadas. De hecho, los anticuerpos pueden clasificarse utilizando el propio suero del paciente como fuente de células del complemento y/o inmunitarias. El anticuerpo que es capaz de activar el complemento o mediar en ADCC en el ensayo *in vitro* puede después usarse terapéuticamente en ese paciente particular.

[0109] En ciertos casos, el agente de unión a Notch o antagonista es un anticuerpo que no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo no tiene actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), y/o ninguna actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En ciertos casos, el anticuerpo no se une al receptor Fc y/o los factores del complemento. En ciertos casos, el anticuerpo no tiene función efectora.

[0110] En otros casos, los antagonistas de un receptor Notch pueden desencadenar la muerte celular indirectamente inhibiendo la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y es un proceso fundamental requerido para el crecimiento normal, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, curación de heridas y en respuesta a la ovulación. El crecimiento de tumores sólidos mayor de 1-2 mm² también requiere angiogénesis para suministrar nutrientes y oxígeno sin los cuales mueren las células tumorales. Así, en ciertos casos, un antagonista de un receptor Notch activa las células vasculares diana que expresan el receptor Notch que incluyen, por ejemplo, células endoteliales, células de músculo liso o componentes de la matriz extracelular requeridos para el ensamblaje vascular. En otros casos, un antagonista de un receptor Notch inhibe la señalización del factor de crecimiento requerida por el reclutamiento, ensamblaje, mantenimiento o supervivencia de células vasculares.

[0111] La presente divulgación proporciona una variedad de polipéptidos que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En ciertos casos, el polipéptido está aislado. En ciertos casos alternativos,

el polipéptido está sustancialmente puro.

[0112] En ciertos casos, los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos que comprenden la secuencia de SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32 (con o sin las secuencias señal indicadas).

[0113] La divulgación proporciona un polipéptido que comprende la cadena pesada y/o la cadena ligera provistas en SEQ ID N°: 10 y/o SEQ ID N°: 4, respectivamente (con o sin las secuencias señal putativas indicadas). En ciertos casos, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertos casos, el polipéptido se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano.

[0114] La divulgación proporciona además un polipéptido que comprende SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32, y/o SEQ ID N°: 14 o SEQ ID N°: 24. En ciertos casos, el polipéptido comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEQ ID N°: 8 y una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID N°: 14. En ciertos casos, el polipéptido comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEQ ID N°: 28 y una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID N°: 24. En ciertos casos, el polipéptido comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEQ ID N°: 32 y una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID N°: 24. En ciertos casos, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertos casos, el polipéptido se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano.

[0115] Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la divulgación pueden variarse sin efecto significativo sobre la estructura o función de la proteína. Sin se contemplan tales diferencias en las secuencias, deberá recordarse que habrá áreas críticas sobre la proteína que determinan la actividad. Así, la divulgación incluye además variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial. Tales mutantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones tipo. Orientación referente a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos pueden encontrarse en Bowie, J.U. y col., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", Science 7990, 247:1306-1310.

[0116] Así, los fragmentos, derivados o análogos de los polipéptidos de la divulgación pueden ser: (i) uno en el cual uno o más de los residuos de aminoácido están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (frecuentemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede o no puede codificarse por el código genético; o (ii) uno en el cual uno o más residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente; o (iii) uno en el cual el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el cual los aminoácidos adicionales se fusionan al polipéptido maduro, tal como la secuencia conductora o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de pro-proteínas. Se considera que tales fragmentos, derivados y análogos están dentro del alcance de las enseñanzas en el presente documento.

[0117] Son de particular interés las sustituciones de aminoácidos cargados con otro aminoácido cargado y con aminoácidos neutros o negativamente cargados. Lo último produce proteínas con una carga positiva reducida. La prevención de la agregación es altamente deseada. La agregación de las proteínas no solamente produce una pérdida de actividad, sino que también puede ser problemático cuando se preparan formulaciones farmacéuticas, debido a que pueden ser inmunógenas (Pinckard y col., Clin. Exp. Immunol. 1967, 2:331-340, Robbins y col., Diabetes 1987, 36:838-845; Cleland y col., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 1993, 10:307-377).

[0118] Por supuesto, el número de sustituciones de aminoácidos hechas depende de muchos factores, que incluyen aquellos descritos en el presente documento. En ciertos casos, el número de sustituciones para cualquier polipéptido dado no será superior a 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 ó 3.

[0119] Los polipéptidos de la presente divulgación incluyen los polipéptidos de SEQ ID N°: 14, así como los polipéptidos que tienen al menos el 90 % de similitud (en ciertos momentos al menos el 90 % de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID N°: 14 y al menos el 95 % de similitud (en ciertos momentos al menos el 95 % de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID N°: 14, y en todavía otros casos, el polipéptido que tiene al menos el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de similitud (en ciertos momentos el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID N°: 14. Los polipéptidos de la presente divulgación incluyen los polipéptidos de SEQ ID N°: 8, así como los polipéptidos que tienen al menos el 90 % de similitud (en ciertos

momentos al menos el 90 % de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID N°: 8 y al menos el 95 % de similitud (en ciertos momentos al menos el 95 % de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID N°: 8, y en todavía otros casos, polipéptidos que tienen al menos el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de similitud (en ciertos momentos el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID N°: 8. Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácido conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

[0120] Los fragmentos o porciones de los polipéptidos de la presente divulgación pueden emplearse para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente por síntesis peptídica; por consiguiente, los fragmentos pueden emplearse como intermediarios para producir los polipéptidos de longitud completa. Los fragmentos o porciones de los polinucleótidos de la presente divulgación pueden usarse para sintetizar polinucleótidos de longitud completa de la presente divulgación.

[0121] En ciertos casos, un fragmento de las proteínas de la presente divulgación es una porción o toda la proteína que es capaz de unirse a la proteína del receptor Notch1. El fragmento tiene una alta afinidad por un receptor Notch1. Ciertos fragmentos de proteínas de fusión son fragmentos de proteínas que comprenden al menos parte del dominio de unión Notch del agente del polipéptido o antagonista fusionado con al menos parte de una región constante de una inmunoglobulina. La afinidad está normalmente en el intervalo de 10^{-11} a 10^{-12} M, aunque la afinidad puede variar considerablemente con fragmentos de diferentes tamaños, que oscilan de 10^{-7} a 10^{-13} M. En algunos casos, el fragmento es de aproximadamente 10-110 aminoácidos de longitud y comprende el dominio de unión Notch del agente o antagonista de polipéptido ligado a al menos parte de una región constante de una inmunoglobulina.

[0122] Los polipéptidos y análogos pueden además modificarse para contener restos químicos adicionales que normalmente no son parte de la proteína. Los restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica y/o la absorción de la proteína. Las fracciones también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario indeseable de la proteína y similares. Una visión general de los restos químicos puede encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

[0123] Los polipéptidos aislados descritos en el presente documento pueden producirse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Tales procedimientos varían de procedimientos de síntesis de proteínas directos para constituir una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos aisladas y que expresan aquellas secuencias en un huésped transformado adecuado.

[0124] En algunos casos de un procedimiento recombinante, una secuencia de ADN se construye aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína natural de interés. Opcionalmente, la secuencia puede mutagenizarse por mutagénesis específica del sitio para proporcionar sus análogos funcionales. Véase, por ejemplo, Zoeller y col., Proc. Nat Acad. Sci. USA 1984, 81:5662-5066 y la patente de EE.UU. nº 4.588.585. Otro procedimiento de construcción de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés sería por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos pueden designarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que están favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés.

[0125] Pueden aplicarse procedimientos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, puede usarse una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen retro-traducido. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado pueden sintetizarse y después ligarse. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente nucleótidos protuberantes en 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

[0126] Una vez ensamblado (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio, u otro procedimiento), las secuencias de ADN mutantes que codifican un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se ligarán operativamente a una secuencia de control de la expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje apropiado puede confirmarse por secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y la expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como es bien conocido en la técnica, con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen está operativamente ligado a las secuencias de control de la expresión transcripcional y traduccional que son funcionales en el huésped de expresión elegido.

[0127] La presente divulgación proporciona anticuerpos aislados contra una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1. El anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, puede ser cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal que reconozca específicamente una región proximal de la membrana del dominio extracelular de Notch1. En algunos casos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales, o sus fragmentos, que se unen específicamente a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un Notch1 humano como se describe en el presente documento. En algunos casos, los anticuerpos monoclonales, o sus fragmentos, son anticuerpos quiméricos o humanizados que se unen específicamente a la región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano como se describe en el presente documento. En otros casos, los anticuerpos monoclonales, o sus fragmentos, son anticuerpos humanos que se unen específicamente a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano como se describe en el presente documento.

[0128] Los anticuerpos contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 encuentran uso en procedimientos experimentales, de diagnóstico y terapéuticos descritos en el presente documento. En ciertos casos, los anticuerpos de la presente divulgación se usan para detectar la expresión de un receptor Notch1 en muestras biológicas tales como, por ejemplo, una biopsia de tejido del paciente, efusión pleural, o muestra de sangre. Pueden seccionarse las biopsias de tejido y detectarse la proteína usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Alternativamente, se aíslan las células individuales de una muestra, y la expresión de la proteína se detecta sobre células fijas o vivas por análisis FACS. Además, pueden usarse anticuerpos sobre matrices de proteína para detectar la expresión de un receptor Notch1, por ejemplo, sobre células tumorales, en lisados celulares, o en otras muestras de proteína. En otros casos, los anticuerpos de la presente divulgación se usan para inhibir el crecimiento de células tumorales poniendo en contacto los anticuerpos con células tumorales tanto en ensayos basados en células *in vitro* como modelos de animal *in vivo*. En todavía otros casos, los anticuerpos se usan para tratar cáncer en un paciente humano administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1.

[0129] Pueden prepararse anticuerpos policlonales por cualquier procedimiento conocido. Los anticuerpos policlonales se producen inmunizando un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón, cabra, burro, etc.) por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (un fragmento de péptido purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc.), opcionalmente conjugados con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, etc., diluido en solución salina estéril y combinado con un adyuvante (por ejemplo, adyuvante completo o incompleto de Freund) para formar una emulsión estable. El anticuerpo policlonal se recupera a continuación de la sangre, ascitis y similares, de un animal así inmunizado. La sangre recogida se coagula, y el suero se decanta, se clarifica por centrifugación y se ensaya para el título de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales pueden purificarse de suero o ascitis según procedimientos estándar en la técnica que incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etc.

[0130] Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando procedimientos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256:495-497. Usando el procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado se inmuniza como se ha descrito anteriormente para provocar la producción de anticuerpos por linfocitos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Tras la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que a continuación pueden seleccionarse de linfocitos no fusionados y células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido como se ha determinado por inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o por un ensayo de unión *in vitro* tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), pueden a continuación propagarse tanto en cultivo *in vitro* usando procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) como *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales pueden a continuación purificarse del medio de cultivo o el líquido ascítico como se ha descrito anteriormente para anticuerpos policlonales.

[0131] En algunos casos de la presente divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 14; y/o una región variable de la cadena ligera que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 8. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 14, y/o una región variable de la cadena ligera que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 8.

En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo.

[0132] En ciertos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un Notch1 humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID N°: 15), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID N°: 16), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYAMDY (SEQ ID N°: 17). En algunos casos, el anticuerpo comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID N°: 18), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID N°: 19), y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID N°: 20). En algunos casos, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID N°: 15), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID N°: 16), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYAMDY (SEQ ID N°: 17); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID N°: 18), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID N°: 19), y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID N°: 20). En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID N°: 15), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID N°: 16), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYAMDY (SEQ ID N°: 17), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos. En otros casos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID N°: 18), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos, (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID N°: 19), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID N°: 20), o una de sus variantes que comprende 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácido conservativas.

[0133] En algunos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo, 52M51, producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 7 de agosto de 2008 y con el número asignado PTA-9405. En algunos casos, el anticuerpo es una versión humanizada de 52M51. En algunos casos, el anticuerpo es una versión humanizada de 52M51, "52M51H4L3", como se codifica por el ADN depositado en la ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008 y con el número asignado PTA-9549. En algunos casos, el anticuerpo es una versión humanizada de 52M51, "52M51H4L4". En algunos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítoto que el epítoto al cual se une el anticuerpo 52M51. En otros casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos descritos en los casos y/o aspectos anteriores, así como otros aspectos/casos descritos en cualquier lugar en el presente documento, para la unión específica a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y procedimientos de tratamiento de cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente eficaces de los anticuerpos.

[0134] En algunos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo, 52R43, como se codifica por el ADN depositado en la ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008 y con el número asignado PTA-9548. En algunos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítoto que el epítoto al cual se une el anticuerpo 52R43. En algunos casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDR de 52R43. En otros casos, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con 52R43. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y los procedimientos de tratamiento de cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente eficaces de los anticuerpos.

[0135] Alternativamente, también pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando procedimientos de ADN recombinante como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de linfocitos B maduros o células de hibridoma, tales como por RT-PCR usando cebadores de oligonucleótido que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesadas y ligeras se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados y a continuación se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que por el contrario no producen la proteína inmunoglobulina. Las células huésped se criban para la producción de anticuerpo monoclonal y se seleccionan anticuerpos con la especificidad deseada. Además, pueden aislarse anticuerpos monoclonales recombinantes o sus fragmentos de las

especies deseadas de bibliotecas de expresión en fago como se ha descrito (McCafferty y col., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson y col., 1991, Nature, 352:624-628, y Marks y col., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[0136] El (Los) polinucleótido(s) que codifica(n) un anticuerpo monoclonal puede(n) modificarse además en un
 5 números de maneras diferentes usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En
 algunos casos, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal
 de ratón pueden sustituirse 1) con aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un
 anticuerpo quimérico o 2) con un polipéptido no de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En otros
 casos, las regiones constantes se truncan o se eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un
 10 anticuerpo monoclonal. Además, puede usarse la mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región
 variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

[0137] Más generalmente, los anticuerpos modificados útiles en la presente divulgación pueden obtenerse o
 derivarse de cualquier anticuerpo. Además, el anticuerpo parental o precursor, o uno de sus fragmentos, usado para
 15 generar los anticuerpos modificados desvelados pueden ser murino, humano, quimérico, humanizado, de primate no
 humano o primatizado. En otros casos, los anticuerpos modificados de la presente divulgación pueden comprender
 construcciones de anticuerpos monocatenarios (tales como las descritas en la patente de EE.UU. nº 5.892.019) que
 tienen dominios constantes alterados como se describe en el presente documento. En consecuencia, cualquiera de
 estos tipos de anticuerpos modificados según las enseñanzas en el presente documento es compatible con la
 20 presente divulgación.

[0138] Según la presente divulgación, las técnicas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos
 monocatenarios específicos para un polipéptido de la divulgación (véase la patente de EE.UU. nº 4.946.778).
 Además, los procedimientos pueden adaptarse para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse y col.,
 25 1989, Science, 246: 1275-1281) para permitir la rápida y eficaz identificación de fragmentos Fab monoclonales con
 la especificidad deseada para Notch o derivados, fragmentos, análogos o sus homólogos. Los fragmentos de
 anticuerpos que contienen los idiotipos para un polipéptido de la divulgación pueden producirse por técnicas en la
 técnica que incluyen, pero no se limitan a: (a) un fragmento F(ab')₂ producido por digestión con pepsina de una
 molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado por la reducción de fuentes de disulfuro de un fragmento
 30 F(ab')₂; (c) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula del anticuerpo con papaína y un agente
 reductor; y (d) fragmentos Fv.

[0139] Los anticuerpos biespecíficos también están dentro del alcance de la divulgación. Los anticuerpos
 biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades
 35 de unión por al menos dos antígenos diferentes.

[0140] Los procedimientos de preparación de anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Por ejemplo,
 en el presente caso, una de las especificidades de unión es por un polipéptido antigénico de la divulgación (Notch1 o
 uno de sus fragmentos), mientras que la segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es
 40 una proteína de la superficie celular, o receptor o subunidad del receptor. La producción recombinante de
 anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de
 inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature
 1983, 305:537-539). Debido a la diversidad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos
 hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo
 45 una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra normalmente por
 cromatografía de afinidad.

[0141] Los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas pueden fusionarse
 con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es con un dominio constante de la cadena
 50 pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. La primera
 región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera puede
 estar presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica las fusiones de la cadena pesada de
 inmunoglobulina, y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión
 separados, y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Detalles adicionales de la generación de
 55 anticuerpos biespecíficos pueden encontrarse en Suresh y col., Methods in Enzymology 1986, 121:210.

[0142] Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de
 anticuerpos. Técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito
 en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Además,

Brennan y col., Science 1985, 229:81 describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂.

5 [0143] Adicionalmente, los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos (Shalaby y col., J. Exp. Med. 1992, 175:217-225). Estos procedimientos pueden usarse en la producción de una molécula de anticuerpo F(ab')₂ biespecífica completamente humanizada.

10 [0144] También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos (Tutt y col., 1991, J. Immunol. 147:60).

[0145] La presente divulgación también engloba anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente la región proximal de la membrana de un dominio extracelular de receptor Notch1. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse específicamente a al menos dos epítopes diferentes. Los diferentes epítopes pueden ser cualquiera que esté dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo Notch1), o sobre moléculas diferentes tales como ambas, por ejemplo, los anticuerpos pueden reconocer y unirse específicamente a un receptor Notch1, así como, por ejemplo, 1) una molécula efectora sobre un leucocito tal como un receptor de linfocitos T (por ejemplo, CD3) o receptor de Fc (por ejemplo, CD64, CD32 o CD16) o 2) un agente citotóxico como se describe en detalle a continuación. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos. Las técnicas para preparar anticuerpos biespecíficos son comunes en la técnica (Millstein y col., 1983, Nature, 305:537-539; Brennan y col., 1985, Science, 229:81; Suresh y col., 1986, Methods in Enzymol, 121:120; Traunecker y col., 1991, EMBO J, 10:3655-3659; Shalaby y col., 1992, J. Exp. Med., 175:217-225; Kostelny y col., 1992, J. Immunol., 148:1547-1553; Gruber y col., 1994, J. Immunol., 152:5368; y la patente de EE.UU. nº 5.731.168).

25 [0146] Anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopes diferentes, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido de la divulgación. Alternativamente, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula del receptor de linfocitos T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG de manera que los mecanismos de defensa celular se centren en la célula que expresa el antígeno particular. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para dirigir los agentes citotóxicos hacia células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA.

35 [0147] También están dentro del alcance de la presente divulgación anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos covalentemente unidos. Se ha propuesto que tales anticuerpos, por ejemplo, dirigen células inmunitarias a células no deseadas (patente de EE.UU. nº 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse 40 inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptoputirimidato de metilo.

[0148] Para los fines de la presente divulgación, debe apreciarse que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1. A este respecto, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que pueda ser inducido para organizar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado al tumor deseado. Es decir, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, primate no humano (por ejemplo, monos cinomolgos, macacos, etc.) o lupino. En algunos casos, tanto las regiones variables como constantes de las 50 inmunoglobulinas modificadas con humanas. En otros casos, las regiones variables de los anticuerpos compatibles (normalmente derivados de una fuente no humana) pueden modificarse o confeccionarse específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, regiones variables útiles en la presente divulgación pueden humanizarse o alterarse de otro modo mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

55 [0149] En algunos casos de la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal contra una región proximal del dominio extracelular del receptor Notch1 es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias mínimas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) dentro de las regiones variables. Tales anticuerpos se usan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas de

HAMA (anticuerpos humanos anti-ratón) cuando se administran a un sujeto humano. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos con secuencias mínimas con respecto a no humanas. Un anticuerpo humano es un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano.

5

[0150] Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Un anticuerpo puede humanizarse sustituyendo la CDR de un anticuerpo humano con la de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada (Jones y col., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann y col., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen y col., 1988, Science, 10 239:1534-1536). El anticuerpo humanizado puede además modificarse por la sustitución del residuo adicional tanto en la región estructural Fv y/o dentro de los residuos no humanos sustituidos para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo.

[0151] En algunos casos de la presente divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 24; y/o una región variable de la cadena ligera que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene al menos el 95 % de identidad de 20 secuencia con SEQ ID N°: 24, y/o una región variable de la cadena ligera que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 28 o SEQ ID N°: 32.

[0152] En algunos casos, el anticuerpo humanizado comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID N° 24 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID N°: 28. En algunos casos, el anticuerpo 25 humanizado comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID N°: 24 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID N°: 32.

[0153] Los anticuerpos humanos pueden prepararse directamente usando varias técnicas conocidas en la técnica. Pueden generarse linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo 30 inmunizado que produce un anticuerpos dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boemer y col., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; y patente de EE.UU. n° 5.750.373). Además, el anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, en la que la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets y col., 1998, PNAS, 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 35 27:381; Marks y col., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Los anticuerpos humanizados también pueden prepararse en ratones transgénicos que contienen un sitio de inmunoglobulina humano que es capaz de producir, tras la inmunización, el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal produce la inhibición completa de 40 la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana a tales ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551; Jakobovits y col., 1993, Nature, 362:255-258; Bruggemann y col., 1993, Year in Immuno. 7:33; patentes de EE.UU. n° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016.

45

[0154] Alternativamente, puede usarse tecnología de expresión en fago para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de reportorios genéticos del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, se clonan genes del dominio V del anticuerpo en el marco en cualquiera de un gen de proteína de la cápside mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan 50 como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe aquellas propiedades. Así, el fago imita alguna de las propiedades del linfocito B. La expresión en fago puede realizarse de una variedad de formatos. Pueden usarse varias fuentes de segmentos del gen V para la expresión en 55 fago. Se ha aislado una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una matriz diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos).

[0155] Como se trató anteriormente, los anticuerpos humanos también generarse por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.567.610 y 5.229.275).

[0156] Se apreciará que el injerto de dominios variables no humanos enteros en regiones constantes humanas producirá anticuerpos quiméricos “clásicos”. En el contexto de la presente solicitud, el término “anticuerpos quiméricos” se mantendrá para significar cualquier anticuerpo en el que la región inmunorreactiva o sitio se obtiene o se deriva de una primera especie y la región constante (que puede ser intacta, parcial o modificada según la presente divulgación) se obtiene de una segunda especie. En algunos casos, la región de unión del antígeno o sitio se formará de una fuente no humana (por ejemplo, ratón) y la región constante es humana. Aunque la especificidad inmunogénica de la región variable no está generalmente afectada por su fuente, es menos probable que una región constante humana provoque una respuesta inmunitaria de un sujeto humano que sería la región constante de una fuente no humana.

[0157] Los dominios variables en tanto las cadenas pesadas como ligeras se alteran por la sustitución al menos parcial de una o más CDR y, si es necesario, por la sustitución de la región estructural parcial y el cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase como el anticuerpo del cual se derivan las regiones estructurales, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de clase diferente y preferiblemente de un anticuerpo de una especie diferente. Debe enfatizarse que puede no ser necesario sustituir todas las CDR con las CDR completas de la región variable del donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede ser solamente necesario transferir aquellos residuos que sean necesarios para mantener la actividad del sitio de unión del antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de EE.UU. nº 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, estará bien dentro de la técnica, tanto llevando a cabo experimentación rutinaria como por pruebas de ensayo y error para obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

[0158] A pesar de las alteraciones en la región variable, se apreciará que los anticuerpos modificados de la presente divulgación comprenderán anticuerpos, o sus fragmentos inmunorreactivos, en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se ha delecionado o alterado de otra forma para así proporcionar características bioquímicas deseadas tales como elevada localización tumoral o semivida en suero reducida cuando se compara con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no alterada. En algunos casos, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatibles con la presente divulgación comprenden adiciones, delecciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados desvelados en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunos casos de la divulgación se contemplan regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios están parcialmente o completamente delecionados. En otros casos, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones con dominio delecionado o variantes en las que se ha eliminado el dominio CH2 completo (construcciones Δ CH2). En todavía otros casos, el dominio de la región constante omitido se sustituirá con un separador de aminoácido corto (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona algo de la flexibilidad molecular normalmente conferida por la región constante ausente.

[0159] Aparte de su configuración, se sabe en la técnica que la región constante media en varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a los anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede participar en hipersensibilidad auto-inmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a las células por la región Fc, con un sitio del receptor de Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Existe varios receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, que incluyen IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc sobre las superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen engullición y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpo, eliminación de complejos inmunitarios, lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por células asesinas (denominado citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulina. Aunque se han estudiado varios receptores de Fc y sitios del receptor a un cierto grado, todavía existe mucho que es desconocido sobre su localización, estructura y funcionamiento.

[0160] Aunque no se limita el alcance de la presente divulgación, se cree que los anticuerpos que comprenden regiones constantes modificadas como se describe en el presente documento proporcionan funciones

efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la delección o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión del receptor de Fc del anticuerpo modificado en circulación aumentando así la localización del tumor. En otros casos puede ser que las modificaciones de la región constante, consistentes con la presente divulgación, moderen la unión del complemento y así reduzcan la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Incluso otras modificaciones de la región constante pueden usarse para eliminar enlaces de disulfuro o restos de oligosacárido que permiten la localización potenciada debido al aumento de la especificidad del antígeno o flexibilidad del anticuerpo. Similarmente, las modificaciones a la región constante según la presente divulgación pueden hacerse fácilmente usando técnicas bioquímicas o de ingeniería molecular muy conocidas.

10

[0161] Se observará que los anticuerpos modificados pueden modificarse para fusionar el dominio CH3 directamente con la región bisagra de los anticuerpos modificados respectivos. En otras construcciones puede ser deseable proporcionar un separador de péptido entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, podrían expresarse construcciones compatibles en las que se ha delecionado el dominio CH2 y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) está unido a la región bisagra con un separador de 5-20 aminoácidos. Tal separador puede añadirse, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra permanezca flexible. Sin embargo, debe observarse que los separadores de aminoácido pueden demostrar, en algunos casos, ser inmunogénicos y provocar una respuesta inmunitaria no deseada contra la construcción. Por consiguiente, cualquier separador añadido a la construcción puede ser relativamente no inmunogénico o, incluso omitirse todo si pueden mantenerse las calidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

[0162] Aparte de la delección de los dominios de la región constante completos, se apreciará que los anticuerpos de la presente divulgación pueden proveerse de delección o sustitución parcial de algunos o incluso un aminoácido individual. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido individual en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y así aumentar la localización del tumor. Similarmente, puede ser deseable simplemente delecionar esa parte de uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión CLQ del complemento) que va a modularse. Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero), mientras que dejan intactas otras funciones deseables asociadas al dominio de la región constante objeto. Además, como se sugiere anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos desvelados pueden modificarse mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencian el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible alterar la actividad provista por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras que se mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Incluso otros casos pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar las características deseables tales como la función efectora o proporcionar más unión de citotoxinas o hidratos de carbono. En tales casos puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de la región constante seleccionados.

[0163] En ciertos casos de la divulgación, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar, por ejemplo, la penetración tumoral. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto y col., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 y Brennan y col., 1985, Science, 229:81). Sin embargo, estos fragmentos se producen ahora normalmente directamente por células huésped recombinantes como se ha descrito anteriormente. Así, los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden todos expresarse en, y secretarse de, *E. coli* u otras células huésped, permitiendo así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Alternativamente, tales fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de fago de anticuerpo tratadas en el presente documento. El fragmento del anticuerpo también puede ser anticuerpos lineales como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.641.870, por ejemplo, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Otras técnicas para la producción de los fragmentos de anticuerpos serán evidentes para un experto en la técnica.

[0164] Además, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpos, modificar un anticuerpo con el fin de aumentar su semivida en suero. Esto puede lograrse, por ejemplo, por la incorporación de un epítipo de unión del receptor salvaje en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o por la incorporación del epítipo en una marca de péptido que a continuación se fusiona con el fragmento del anticuerpo en cualquier extremo o en la parte media (por ejemplo, por ADN o síntesis de péptidos).

[0165] La presente divulgación engloba además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o sus fragmentos de anticuerpo, expuestos en el presente documento. Éstas pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservativas, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico, o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se pretende por una sustitución del aminoácido conservativa es muy conocido en la técnica.

[0166] La divulgación también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas

[0167] (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos), isótopos radiactivos (es decir, radioconjugados), etc. Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes de intercalación. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que pueden utilizarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina, 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. En algunos casos, los anticuerpos pueden conjugarse con radioisótopos, tales como ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re y ¹⁸⁸Re usando cualquiera de varios quelantes bien conocidos o marcación directa. En otros casos, las composiciones desveladas pueden comprender anticuerpos acoplados a fármacos, profármacos o lincinas tales como interferón. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-pirididitiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como toluileno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). También pueden usarse conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina. En algunos casos, los anticuerpos modificados pueden complejarse con otros ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, anticuerpos o sus fragmentos) en los que la molécula resultante se une a tanto la célula neoplásica como a una célula efectora tal como un linfocito T.

[0168] Independientemente de cómo se obtienen las cantidades útiles, los anticuerpos de la presente divulgación pueden usarse en cualquiera de varias formas conjugadas (es decir, inmunoconjugados) o sin conjugar. Alternativamente, los anticuerpos de la presente divulgación pueden usarse en una forma no conjugada o “desnuda” para emplear los mecanismos de defensa naturales del sujeto que incluyen la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la toxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) para eliminar las células malignas. La selección de qué anticuerpo conjugado o modificado sin conjugar usar dependerá del tipo y etapa del cáncer, uso de tratamiento auxiliar (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y la condición del paciente. Se apreciará que podría hacerse fácilmente una selección tal en vista de las enseñanzas en el presente documento.

[0169] Pueden usarse ensayos de competencia para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo epítipo reconociendo epítopos idénticos o que se solapan estéricamente. Pueden usarse cualquier procedimiento conocido para un experto en la técnica para determinar la unión competitiva (tal como, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en cualquier lugar en el presente documento).

[0170] Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ensayarse para la unión inmuno-específica por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales el análisis Biacore, el análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, análisis de transferencia Western, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayo tipo “sándwich”, ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitina, reacción de precipitina de difusión con gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, ensayo de fijación del complemento, ensayo inmunoradiométrico, inmunoensayo fluorescente e inmunoensayo de proteína A. Tales ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

[0171] En algunos casos de la presente divulgación, la inmunoespecificidad de un anticuerpo contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se determina usando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar el antígeno, recubrir pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo contra un marcador de células madre cancerígenas conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. Alternativamente, el antígeno contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano no se conjuga con un compuesto detectable, sino que en su lugar se añade al pocillo un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el anticuerpo contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano puede cubrir el pocillo y un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable puede añadirse tras la adición del antígeno al pocillo recubierto. Un experto en la técnica sabe qué parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York en 11.2.1).

[0172] La afinidad de unión de un anticuerpo por una región proximal de la membrana del dominio extracelular del receptor Notch1 y la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I), o un fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, seguido por la detección del anticuerpo que se une al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo contra la región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano y las constantes de disociación de la unión pueden determinarse de los datos por el análisis de la representación de Scatchard. En algunos casos, se usa el análisis cinético Biacore para determinar las constantes de asociación y disociación de la unión del anticuerpo contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. El análisis cinético Biacore comprende analizar la unión y disociación de los anticuerpos de chips con antígeno inmovilizado, por ejemplo, receptores Notch1, sobre su superficie.

[0173] En ciertos casos, la divulgación engloba polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, contra una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular Notch1 humano. El término "polinucleótido que codifica un polipéptido" engloba un polinucleótido que incluye solo secuencias codificantes para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes adicionales. Los polinucleótidos de la divulgación pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (antisentido). Los polinucleótidos de la divulgación pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, ADN que incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (antisentido).

[0174] La presente divulgación se refiere además a variantes de los polinucleótidos anteriormente descritos en el presente documento que codifican fragmentos, análogos y derivados. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica que se produce naturalmente del polinucleótido o una variante que no se produce naturalmente del polinucleótido.

[0175] Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, el polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica que se produce naturalmente de la secuencia codificante de los polipéptidos descritos. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alterna de una secuencia de polinucleótidos que tiene una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos, que no altera sustancialmente la función del polipéptido codificado.

[0176] La presente divulgación también incluye polinucleótidos, en los que la secuencia codificante para el polipéptido maduro puede fusionarse en el mismo marco de lectura con un polinucleótido que ayuda en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped, por ejemplo, una secuencia conductora que funciona como secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia conductora es una pre-proteína y puede tener la secuencia conductora escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una pro-proteína que es la proteína madura más residuos de aminoácido de 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una pro-

secuencia es una pro-proteína y una forma inactiva de la proteína. Una vez que se escinde la pro-secuencia, queda una proteína madura activa. Así, por ejemplo, el polinucleótido de la presente divulgación puede codificar una proteína madura, o una proteína que tiene una pro-secuencia o una proteína que tiene tanto una pro-secuencia como una pre-secuencia (secuencia conductora).

5

[0177] Los polinucleótidos de la presente divulgación también pueden tener la secuencia codificante fusionada en marco con una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente divulgación. La secuencia marcadora puede ser una marca de hexa-histidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado con el marcador en el caso de un huésped bacteriano, o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una marca de hemaglutinina (HA) cuando se usa un huésped mamífero, por ejemplo, células COS-7. La marca HA se corresponde con un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., 1984, Cell 37:767).

10

[0178] Casos adicionales de la divulgación incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos el 90 % idéntica, el 95 % idéntica, y en algunos casos al menos el 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las secuencias desveladas. En algunos casos, los polinucleótidos tienen una secuencia de nucleótidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID N°: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 21, 25 ó 29 (con o sin secuencia señal). En algunos casos, los polinucleótidos tienen una secuencia de nucleótidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID N°: 7 ó 13. En algunos casos, la divulgación proporciona un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que codifica los polipéptidos de SEQ ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 30, 31 ó 32. En algunos casos, los polinucleótidos se hibridan con los polinucleótidos de SEQ ID N°: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 21, 25 ó 29. En algunos casos, los polinucleótidos se hibridan bajo condiciones de hibridación rigurosas.

15

20

[0179] Como se usa en el presente documento, los términos “se hibrida” o “se hibrida selectivamente” o “se hibrida específicamente” se refieren a la unión o duplexado de una molécula sola a una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones de hibridación rigurosas cuando la secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, biblioteca de ADN o ARN). Véase, por ejemplo, Andersen (1998) *Nucleic Acid Hybridization* Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) *Nucleic Acid Hybridization* Wiley.

25

[0180] Como se usa en el presente documento, el término “condiciones de hibridación rigurosas” se refiere a condiciones bajo las que una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, normalmente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas mayores. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology — Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5 -10 °C inferior al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una resistencia iónica definida. La T_m es la temperatura (bajo resistencia iónica definida, pH y concentración nucleica) a la cual el 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m, el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de ión sodio, normalmente aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ión sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (es decir, superior a 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación de alta rigurosidad, una señal positiva es al menos dos veces la referencia, o 10 veces la hibridación de referencia. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad o rigurosas a modo de ejemplo incluyen: 50 % de formamida, 5x SSC, y 1 % de SDS incubado a 42 °C o 5x SSC y 1 % de SDS incubado a 65 °C, con un lavado en 0,2x SSC y 0,1 % de SDS a 65 °C. Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36 °C es típica para amplificación de rigurosidad baja, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar de aproximadamente 32 °C a aproximadamente 48 °C dependiendo de la longitud del cebador. Para amplificación por PCR de rigurosidad alta, una temperatura de aproximadamente 62 °C es típica, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden oscilar de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, dependiendo de la longitud del cebador y la especificidad. Las condiciones de ciclo típicas para ambas amplificaciones de rigurosidad alta y baja incluyen una fase de desnaturalización de 90 °C a 95 °C durante 30-120 s, una fase de hibridación que dura 30-120 s, y una fase de extensión de aproximadamente 72 °C por 1-2 min.

30

35

40

45

50

55

[0181] Por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, el 95 % “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea

idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden delecionarse o

5

sustituirse con otro nucleótido, o varios nucleótidos hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones del extremo amino o carboxi de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre aquellas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

10

[0182] Como una cuestión práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico particular es al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de referencia puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos conocidos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se utiliza Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, el 95 % idéntica a una secuencia de referencia según la presente divulgación, los parámetros se establecen, por supuesto, de tal forma que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y que se permitan huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

15

20

[0183] Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. En algunos casos, las variantes de polinucleótidos contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o delecciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunos casos, se producen variantes de nucleótidos por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polinucleótidos pueden producirse por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón para un huésped particular (por ejemplo, cambiar codones en el ARNm humano a los preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*).

25

[0184] Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra una región proximal de la membrana de unión de no ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la divulgación pueden variarse sin afectar significativamente la estructura o función de la proteína. Así, la divulgación incluye además variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. Tales mutantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones tipo.

30

35

[0185] Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente divulgación se proporcionan en una forma aislada, y a veces se purifican a homogeneidad.

40

[0186] Los polipéptidos aislados descritos en el presente documento pueden producirse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Tales procedimientos varían de procedimientos de síntesis de proteínas directa a construir una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos aisladas y que expresan aquellas secuencias en un huésped transformado adecuado. Por ejemplo, puede obtenerse ADNc cribando una biblioteca de ADNc humano con un fragmento de ADN marcado que codifica un polipéptido (por ejemplo, el nucleótido SEQ ID N°: 1) e identificando clones positivos por autorradiografía. Se realizan rondas adicionales de purificación en placa e hibridación usando procedimientos convencionales.

45

[0187] En algunos casos de un procedimiento recombinante, se construye una secuencia de ADN aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína natural de interés. Opcionalmente, la secuencia puede mutagenizarse por mutagénesis específica del sitio para proporcionar sus análogos funcionales. (Véase, por ejemplo, Zoeller y col., 1984, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:5662-5066 y la patente de EE.UU. n° 4.588.585). Otro procedimiento de construcción de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés sería por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que están favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés.

50

55

[0188] Pueden aplicarse procedimientos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislada que

codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, puede usarse una secuencia aminoácidos completa para construir un gen retro-traducido. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, pueden sintetizarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y después ligarse. Los oligonucleótidos individuales normalmente contienen nucleótidos protuberantes en 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

5 **[0189]** Una vez ensamblado (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro procedimiento), las secuencias de ADN mutantes que codifican un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se ligarán operativamente a una secuencia de control de la expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje apropiado puede confirmarse por secuenciación de nucleótidos, mapeo por restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como es bien conocido en la técnica, con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen está operativamente ligado a secuencias de control de la expresión transcripcionales y traduccionales que son funcionales en el huésped de expresión elegido.

15 **[0190]** Se usan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar ADN que codifica fusiones de polipéptidos marcadores de células madre. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos sintéticos o de ADN derivados de ADNc que codifican una fusión de polipéptidos marcadores de células madre cancerígenas o un análogo bioequivalente operativamente ligado a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados derivados de genes de mamífero, microbianos, virales o de insecto. Una unidad transcripcional generalmente comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores de la transcripción, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce dentro de la proteína, y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción y traducción apropiadas, como se describen en detalle más adelante. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Adicionalmente puede incorporarse la capacidad para replicar en un huésped, normalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN están operativamente ligadas cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (conductor secretor) está operativamente ligado a ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente ligado a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si se coloca para así permitir la traducción. Generalmente, operativamente ligado significa contiguo y, en el caso de conductores secretores, significa contiguo y en marco de lectura. Los elementos estructurales previstos para uso en los sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia conductora que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, si la proteína recombinante se expresa sin una secuencia conductora o de transporte, puede incluir un residuo de metionina del extremo N. Este residuo puede opcionalmente escindir-se posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

40 **[0191]** La elección de la secuencia de control de la expresión y el vector de expresión dependerán de la elección del huésped. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión. Vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Escherichia coli*, que incluyen pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, y plásmidos en amplio intervalo de huésped, tales como M13 y fagos de ADN monocatenario filamentosos.

50 **[0192]** Células huésped adecuadas para la expresión de una proteína marcadora de células madre cancerígenas incluyen células procariotas, de levadura, de insecto o eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe a continuación. También podrían utilizarse sistemas de traducción sin células. Vectores de clonación y expresión apropiados para uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamífero se describen por Pouwels y col. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N. Y., 1985).

55 **[0193]** También se emplean ventajosamente varios sistemas de cultivo de células de mamíferos o de insecto para expresar proteína recombinante. Puede realizarse la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero debido a que tales proteínas generalmente están correctamente plegadas, apropiadamente modificadas y son completamente funcionales. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero adecuadas incluyen líneas

COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (1981, Cell, 23:175), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado que incluyen, por ejemplo, células L, C127, 3T3, líneas celulares de ovario de hámster Chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y potenciador ligado al gen que va a expresarse, y otras

5 secuencias no transcritas que flanquean 5' o 3', y secuencias no transcritas de 5' o 3', tales como sitios de unión al ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, y secuencias de terminación de la transcripción. Sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto se revisan por Luckow y Summers, 1988, Bio/Technology, 6:47.

10 **[0194]** Las proteínas producidas por un huésped transformado pueden purificarse según cualquier procedimiento adecuado. Tales procedimientos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Marcas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de recubrimiento de gripe y glutatión-S-transferasa pueden unirse a la proteína para permitir la

15 fácil purificación por paso sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente usando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos x.

[0195] Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo pueden concentrarse primero usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tienen grupos dietilaminoetilo (DEAE) laterales. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de

25 proteínas. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio catiónico. Intercambiadores catiónicos adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, pueden usarse una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) que emplea medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo laterales u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una proteína recombinante o una composición de proteína de células madre cancerígenas-Fc. También pueden emplearse algunas o todas de las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

30

[0196] La proteína recombinante producida en un cultivo bacteriano normalmente se aísla por la extracción inicial de sedimentos celulares, seguido de una o más etapas de concentración, precipitación por sales, cromatografía de intercambio iónico acuoso o exclusión de tamaño. Puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación finales. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden alterarse por cualquier procedimiento conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o el uso de agentes de lisis.

35

[0197] La presente divulgación también proporciona procedimientos de inhibición del crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre cancerígenas usando los antagonistas de un marcador de células madre cancerígenas descrito en el presente documento. En algunos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre cancerígenas, por ejemplo el receptor Notch1, comprende poner en contacto la célula con un antagonista contra un marcador de células madre cancerígenas *in vitro*. Por ejemplo, una línea celular inmortalizada o una línea celular cancerígena que expresa un

45 marcador de células madre cancerígenas se cultiva en medio al que se añade un antagonista del marcador de células madre cancerígenas expresado para inhibir el crecimiento celular. En algunos casos, las células tumorales que comprenden células madre de tumor se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural o muestra de sangre y se cultivan en medio al que se añade un antagonista de un

50 marcador de células madre cancerígenas para inhibir el crecimiento celular. En algunos casos, el antagonista es un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo de una proteína marcadora de células madre cancerígenas. Por ejemplo, pueden añadirse anticuerpos contra una proteína marcadora de células madre cancerígenas al medio de cultivo de células madre cancerígenas aisladas para inhibir el crecimiento celular.

[0198] En algunos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre cancerígenas comprende poner en contacto la célula con un antagonista contra un marcador de células madre cancerígenas *in vivo*. En algunos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de células tumorigénicas que expresan Notch1 comprende poner en contacto las células con un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando de un

receptor Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorigénicas inhibiendo la actividad de Notch1. En algunos casos, el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorigénicas inhibiendo la señalización de Notch1 inducida por el ligando. En algunos casos, el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorigénicas inhibiendo la escisión de Notch1. En algunos casos, el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorigénicas reduciendo la frecuencia o el número de células madre cancerígenas en el tumor.

5 **[0199]** En ciertos casos, el poner en contacto una célula tumorigénica con un antagonista para un marcador de células madre cancerígenas se lleva a cabo en un modelo de animal. Por ejemplo, se cultivan xenoinjertos que expresan un marcador de células madre cancerígenas en ratones inmunodeprimidos (por ejemplo, ratones
10 NOD/SCID) a los que se les administra un antagonista para un marcador de células madre cancerígenas para inhibir el crecimiento tumoral. En algunos casos, las células madre cancerígenas que expresan un marcador de células madre cancerígenas se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, biopsia de tejido, efusión pleural o muestra de sangre y se inyecta en los ratones inmunodeprimidos a los que después se les administra un antagonista
15 contra el marcador de células madre cancerígenas para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunos casos, el antagonista de un marcador de células madre cancerígenas se administra al mismo tiempo o en poco después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para prevenir el crecimiento tumoral. En otros casos, el anticuerpo contra el marcador de células madre cancerígenas se administra con un agente terapéutico después de que las células tumorigénicas hayan crecido a un tamaño especificado.

20 **[0200]** La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos, polipéptidos u otros agentes que eligen como diana un marcador de células madre cancerígenas. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en inhibir el crecimiento tumoral, crecimiento de células tumorales y tratar cáncer en pacientes humanos.

25 **[0201]** Se preparan formulaciones para almacenamiento y uso combinando un antagonista purificado (por ejemplo, anticuerpo) de la presente divulgación con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, vehículo, excipiente, etc.) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición Mack Publishing, 2000). Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones no tóxicos tales como
30 fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro sódico; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina,
35 asparagina, histidina, arginina o lisina; hidratos de carbono tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos tales como los complejos de Zn-proteína; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

40 **[0202]** La composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse en cualquier número de formas para tanto tratamiento local como sistémico. La administración puede ser tópica (tal como a las membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal) tal como parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos y polvos; pulmonar tal como por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles (incluyendo por nebulizador), intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica; oral; parenteral
45 incluyendo inyección o infusión intravenosa, intrarterial, intratumoral, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal tal como intratecal o intraventricular.

[0203] La formulación terapéutica puede estar forma de dosificación unitaria. Tales formulaciones incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, disoluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o
50 supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración por inhalación. En las composiciones sólidas tales como comprimidos, el principal principio activo se mezcla con un vehículo farmacéutico. Ingredientes formadores de comprimidos convencionales incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes (por ejemplo, agua) para formar una composición de pre-formulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente
55 divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. La composición de pre-formulación sólida se subdivide a continuación en formas de dosis unitarias del tipo descrito en el presente documento. Los comprimidos, píldoras, etc., de la composición novedosa pueden recubrirse o por el contrario combinarse para proporcionar una forma de dosificación que proporciona la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una composición interna cubierta por un componente externo. Además, los dos

componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permitir que el componente interno pase intacto a través del estómago o sea de liberación retardada. Puede usarse una variedad de materiales tales como capas entéricas o recubrimientos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como Shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

5

[0204] Las formulaciones farmacéuticas incluyen anticuerpos de la presente divulgación complejados con liposomas (Epstein y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688; Hwang, y col., 1980, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030, y patentes de EE.UU. nº 4.485.045 y 4.544.545). Se describen liposomas con tiempo de circulación mejorado en la patente de EE.UU. nº 5.013.556. Algunos liposomas pueden generarse por evaporación en fase
10 inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado.

[0205] Los anticuerpos también pueden atraparse en microcápsulas. Tales microcápsulas se preparan, por
15 ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en microemulsiones como se describe en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing (2000).

20

[0206] Además, pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles tales como poli(2-
25 hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato-acetato de sacarosa y ácido poli-D(-)-3-hidroxitúterico. En algunos casos, los anticuerpos pueden usarse para tratar varias afecciones caracterizadas por la expresión y/o sensibilidad
30 aumentada de las células a un marcador de células madre cancerígenas. Particularmente, se prevé que los anticuerpos contra el marcador de células madre cancerígenas, por ejemplo, Notch1, se use para tratar trastornos proliferativos que incluyen, pero no se limitan a, tumores benignos y malignos del riñón, hígado, vejiga, mama, estómago, ovario, colon, recto, próstata, pulmón, vulva, tiroides, cabeza y cuello, cerebro (glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, etc.), sangre y linfa (leucemias y linfomas).

35

[0207] En algunos casos, el tratamiento implica la administración combinada de un anticuerpo u otro agente de la presente divulgación y un agente quimioterapéutico o mezcla de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un anticuerpo puede producirse antes de, simultáneamente a, o posterior a la administración de quimioterapias. Las quimioterapias contempladas por la divulgación incluyen sustancias químicas
40 o fármacos que son conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles, tales como doxorubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citoxina, taxol, metrotrexato, cisplatino, melfalan, vinblastina y carboplatino. La administración combinada puede incluir la co-administración, tanto en una única formulación farmacéutica como usando formulaciones separadas, o administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un periodo de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer
45 sus actividades biológicas simultáneamente. La preparación y los programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según las instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

50

[0208] Agentes quimioterapéuticos útiles en la presente divulgación también incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (Cytosan); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina, mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina,
55 ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina,

marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato 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, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato, defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxana; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.) y doxetaxel (Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidores de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0209] En ciertos casos, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de la topoisomerasa. Los inhibidores de la topoisomerasa son agentes de quimioterapia que interfieren con la acción de una enzima topoisomerasa (por ejemplo, topoisomerasa I o II). Los inhibidores de la topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, HCl de doxorubicina, citrato de daunorubicina, HCl de mitoxantrona, actinomicina D, etopósido, HCl de topotecan, tenipósido (VM-26) e irinotecan.

[0210] En ciertos casos, el agente quimioterapéutico es un anti-metabolito. Un anti-metabolito es un químico con una estructura que es similar a un metabolito requerido para las reacciones bioquímicas normales, aunque lo suficientemente diferente para interferir con una o más de las funciones normales de las células tales como la división celular. Los anti-metabolitos incluyen, pero no se limitan a, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, metotrexato sódico, raltrexed, Pemetrexed, tegafur, citosina arabinósido, tioguanina (GlaxoSmithKline), 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina y cladribina, así como sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de éstos.

[0211] En otros casos, el tratamiento implica la administración combinada de un anticuerpo u otro agente de la presente divulgación y radioterapia. El tratamiento con un anticuerpo puede producirse antes de, simultáneamente a, o posterior a la administración de radioterapia. Puede usarse cualquier programa de dosificación para tal radioterapia como se determina por el médico habitual.

[0212] En otros casos, el tratamiento puede implicar la administración combinada de anticuerpos de la presente divulgación con otros anticuerpos contra antígenos asociados a tumores adicionales que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen al receptor de EGF (EGFR) (Erbix®), el receptor de erbB2 (HER2) (Herceptin®) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Avastin®). Además, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citocinas; puede ir acompañado de eliminación quirúrgica de células cancerígenas; y/o cualquier otra terapia considerada necesaria por un médico tratante.

[0213] Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo u otro agente de la presente divulgación depende del tipo de enfermedad que va a tratarse, la gravedad y el curso de la enfermedad, la sensibilidad de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines terapéuticos o preventivos, terapia previa, historia clínica del paciente, etc., todo a discreción del médico tratante. El anticuerpo o agente puede administrarse una vez o durante una serie de tratamientos que duran de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un antagonista individual. El médico que administra

puede determinar fácilmente dosis óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal y puede administrarse una o más veces diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación basándose en los tiempos de residencia medidos y las concentraciones de anticuerpo o agente en fluidos corporales o tejidos.

[0214] La presente divulgación proporciona kits que comprenden los anticuerpos descritos en el presente documento y que pueden usarse para realizar los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos casos, un kit comprende al menos un anticuerpo purificado contra un marcador de células madre cancerígenas, en uno o más recipientes. En algunos casos, un kit comprende al menos un anticuerpo purificado contra una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano, en uno o más recipientes. En algunos casos, un kit comprende el anticuerpo 52M51 o una variante humanizada de 52M51. En algunos casos, un kit comprende el anticuerpo 52R43. En algunos casos, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para llevar a cabo un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, indicaciones para realizar ensayos, y cualquier software necesario para el análisis y la presentación de resultados. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los anticuerpos desvelados en la presente divulgación pueden incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

[0215] En ciertos casos, la presente divulgación proporciona un procedimiento de identificación de una molécula que se une a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento tumoral, comprendiendo el procedimiento: i) incubar la molécula con la región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano; ii) determinar si la molécula se une a la región proximal de la membrana del dominio extracelular del receptor Notch humano; y iii) determinar si la molécula inhibe el crecimiento tumoral. Las moléculas que se unen específicamente a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos y anticuerpos.

[0216] El cribado puede realizarse usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. En ciertos casos, el cribado se realiza *in vitro*. En algunos casos, las células que expresan una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se incuban con una molécula marcada y la unión específica de la molécula marcada a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se determina por análisis FACS. En algunos casos, una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se expresa por expresión en fago, y se identifican las moléculas que se unen específicamente a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano. Otros procedimientos adecuados para identificar moléculas que se unen específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando de un receptor Notch1 humano incluyen, pero no se limita a, ELISA; Western (o inmuno)transferencia; y doble híbrido en levaduras.

[0217] Las moléculas que se unen específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se ensayan después para la inhibición del crecimiento de células tumorales. Las pruebas pueden realizarse usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. En ciertos casos, las moléculas que se unen específicamente a la región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se prueban para la capacidad para inhibir el crecimiento tumoral *in vitro*. En algunos casos, las moléculas que se unen específicamente a la región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se incuban con células tumorales en cultivo y la proliferación de las células tumorales en presencia de la molécula que se une específicamente a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se determina y compara con células tumorales incubadas con una molécula de control no de unión. En ciertos casos, las moléculas que se unen específicamente a la región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se prueban para la capacidad para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. En ciertos casos, las moléculas que se unen específicamente a una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se inyectan en un modelo de xenoinjerto de animal y el crecimiento de los tumores en los animales tratados con moléculas que se unen específicamente a la región proximal de la membrana del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano se determina y compara con animales tratados con una molécula de control no de unión.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0218] Se generaron anticuerpos contra una región de unión no de ligando de Notch1, específicamente la región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular. En ciertos casos, se generaron fragmentos de polipéptido recombinante del dominio extracelular Notch1 humano como antígenos para la producción de anticuerpos. Se usó tecnología de ADN recombinante estándar para aislar polinucleótidos que codifican los aminoácidos 1427-1732 (SEQ ID N°: 1) de la región proximal de la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano. Estos polinucleótidos se ligaron de forma separada en marco en el extremo N a un Fc humano y marca de histidina y se clonaron en un vector de plásmido de transferencia para la expresión mediada por baculovirus en células de insecto. Se usaron protocolos de estándar de transfección, infección y cultivo celular para producir células de insecto recombinantes que expresan el polipéptido de Notch1 correspondiente a una región proximal de la membrana que comprende los aminoácidos 1427-1732 (SEQ ID N°: 2) (O'Reilly y col., 1994, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press).

[0219] El polipéptido de la región proximal de la membrana Notch1 (aminoácidos de Notch1 1472-1732) se purificó de lisados de células de insecto usando proteína A y cromatografía de afinidad por quelato de Ni⁺⁺ como se conoce por un experto en la técnica. El polipéptido de la región proximal de la membrana Notch1 purificado se dializó contra PBS (pH=7), se concentró a aproximadamente 1 mg/ml y esterilizó por filtración en la preparación para la inmunización.

[0220] Se inmunizaron ratones (n=3) con la proteína antígeno Notch1 purificada (Antibody Solutions; Mountain View, CA) usando técnicas estándar. La sangre de los ratones individuales se filtró aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial para el reconocimiento de antígeno usando ELISA y análisis FACS (como se describe en el presente documento). Se seleccionaron los dos animales con los mayores títulos de anticuerpo para el refuerzo de antígeno final después tras lo cual las células del bazo se aislaron para la producción de hibridomas. Las células de hibridoma se sembraron a 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos, y el sobrenadante de cada pocillo se cribó por ELISA y análisis FACS contra el polipéptido de la región proximal de la membrana Notch1. Se seleccionaron varios hibridomas con alto título de anticuerpo y se ampliaron en un cultivo en matraz estático. Los anticuerpos se purificaron del sobrenadante de hibridoma usando cromatografía en agarosa de proteína A o proteína G. Los anticuerpos monoclonales purificados se probaron de nuevo por FACS como se describe en el presente documento. Se aislaron varios anticuerpos que reconocieron la región proximal de la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano. Una línea celular de hibridoma que expresa el anticuerpo 52M51 se depositó en la ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 7 de agosto de 2008, y se le asignó la designación de depósito de patente ATCC PTA-9405. Se determinaron las secuencias de nucleótidos y de proteínas predichas de tanto la cadena pesada (SEQ ID N°: 9 y 10) como la cadena ligera (SEQ ID N°: 3 y 4) del anticuerpo 52M51.

35 Anticuerpos humanos

[0221] En realizaciones alternativas, se aislaron anticuerpos humanos que reconocen específicamente la región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 usando tecnología de expresión en fago. En ciertas realizaciones, una biblioteca de anticuerpos sintéticos que contiene dominios variables de anticuerpos humanos se cribó para el reconocimiento específico y de alta afinidad de un antígeno del receptor Notch descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, se cribó una biblioteca de expresión en fago Fab humano usando una serie de proteínas recombinantes que comprenden la región proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1. Brevemente, se incuban 2×10^{13} partículas de fago que expresan Fab con proteína recombinante (pasivamente inmovilizada) en la ronda uno, el fago no específico se lava y a continuación se eluye el fago específico con tanto pH bajo (células) como DTT (proteína recombinante). La producción eluida se usa para infectar bacterias TG1 F+, rescatadas con fago colaborador, y a continuación la expresión en Fab se induce con IPTG (0,25 mM). Este procedimiento se repite durante dos rondas adicionales y a continuación la tercera ronda se criba en ELISA contra el antígeno pasivamente inmovilizado (5 µg/ml).

[0222] Los casetes de CDR en la biblioteca se intercambian específicamente por sitios de restricción de flaqueo únicos para la optimización del anticuerpo. Las regiones variables humanas optimizadas se clonan a continuación en un vector de expresión de Ig que contiene la cadena pesada y la cadena ligera kappa de IgG1 humana para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO.

Mapeo del epítopes

[0223] Para identificar anticuerpos que reconocen específicamente una región proximal de la membrana de

unión no de ligando de los dominios extracelulares del receptor Notch1, se realiza mapeo de epítopes. En ciertas realizaciones, se generan vectores de plásmido de expresión de mamífero que comprenden un promotor del CMV aguas arriba de los polinucleótidos que codifican fragmentos del dominio Notch1 extracelular como proteínas de fusión de Fc usando tecnología de ADN recombinante estándar. En ciertas realizaciones, el mapeo de epítopes de las series 52M de los anticuerpos de la región de unión no de ligando se hace usando una serie de proteínas de fusión y deleciones de la región proximal de la membrana del dominio extracelular de un Notch1 humano de aproximadamente el aminoácido 1427 a aproximadamente el aminoácido 1732. Estas proteínas de fusión recombinantes se expresan en células HEK 293 transitoriamente transfectadas de las cuales se recoge medio acondicionado veinticuatro a cuarenta y ocho horas después de la transfección por ELISA.

10

[0224] En ciertas realizaciones, los fragmentos de la proteína de fusión Notch1 se separan sobre geles de SDS-PAGE y se sondan con ambos anticuerpos anti-Fc para detectar la presencia de todas las proteínas de fusión contra anticuerpos anti-Notch1 para detectar los dominios reconocidos por cada anticuerpo anti-Notch.

[0225] Para identificar epítopes específicos dentro de los dominios extracelulares reconocidos por un anticuerpo contra Notch1 se usa el sistema SPOTs (Sigma Genosys, The Woodlands, TX). Una serie de péptidos lineales de 10 residuos que se solapan por un aminoácido y que cubren el dominio extracelular Notch1 completo se sintetizan y se unen covalentemente a una membrana de celulosa por la técnica de síntesis SPOT. La membrana se pre-incuba durante 8 horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo y se hibrida con anticuerpo durante la noche a 4 °C. A continuación, la membrana se lava, se incuba con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ), se vuelve a lavar y se visualiza con disolución de desarrollo de señales que contiene 3-amino-9-etilcarbazol. Así se determinan epítopes específicos reconocidos por un anticuerpo.

25 Anticuerpos quiméricos

[0226] Después de identificarse anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente un dominio proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1, estos anticuerpos se modifican para superar la respuesta inmunitaria del anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) cuando se usan anticuerpos de roedor como agentes terapéuticos. Las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal seleccionado se aíslan por RT-PCR de células de hibridoma y se ligan en marco a las regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa de IgG1 humana, respectivamente, en vectores de expresión de mamífero. Alternativamente, se usa un vector de expresión de Ig humana tal como TCAE 5.3 que contiene los genes de la región constante de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa de IgG1 humana sobre el mismo plásmido (Preston y col., 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42). Los vectores de expresión que codifican cadenas pesadas y ligeras quiméricas se co-transfectan a continuación en células de ovario de hámster Chino (CHO) para la producción del anticuerpo quimérico. Se comparan la inmunorreactividad y la afinidad de los anticuerpos quiméricos con los anticuerpos murinos parentales por ELISA y FACS.

40 Anticuerpos humanizados

[0227] Como los terapéuticos de anticuerpo quimérico todavía son frecuentemente antigénicos, produciendo una respuesta inmunitaria de un anticuerpo humano anti-quimérico (HACA), los anticuerpos quiméricos contra un dominio proximal de la membrana de unión no de ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 pueden requerir humanización adicional. Para generar anticuerpos humanizados, las tres secuencias hipervariables cortas o regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo quimérico se modifican usando tecnología de ADN recombinante en la región estructural del dominio variable de una secuencia de cadena pesada y ligera humana, respectivamente, y a continuación se clonan en un vector de expresión de mamífero para la expresión en células CHO. Se comparan la inmunorreactividad y la afinidad de los anticuerpos humanizados con anticuerpos quiméricos parentales por ELISA y FACS. Adicionalmente, puede usarse mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc., del anticuerpo humanizado.

Ejemplo 2

55

[0228] Se generaron anticuerpos humanizados contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un Notch1 humano. Los dominios variables del anticuerpo monoclonal murino 52M51 se aislaron y secuenciaron de la línea de hibridoma usando PCR degenerada esencialmente como se describe en Larrick, J. M., y col., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160: 1250 y Jones, S.T. & Bendig, M.M., 1991, *Bio/Technology* 9:88. Las

regiones estructurales variables de la cadena pesada y ligera humanas que probablemente son estructuralmente similares a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo 52M51 parental se consideran a continuación regiones estructurales humanas de referencia para ayudar a guiar el diseño de las regiones estructurales sintéticas novedosas. Para identificar las regiones estructurales humanas que tienen similitud con las regiones estructurales murinas de 52M51, las secuencias de proteína predichas codificadas por los dominios variables murinos V_H y V_L de 52M51 se comparan con secuencias de anticuerpo humano codificadas por ADNc humano expresado usando búsquedas en BLAST de secuencia humana depositada en Genbank. Usando este procedimiento, se seleccionaron secuencias de ADNc humanas (por ejemplo, genbank DA975021, DB242412) y dominios V_H de la línea germinal (por ejemplo, IGHV1-24) para el análisis adicional en el diseño de regiones estructurales de cadena pesada.

10 Similarmente, las secuencias de ADNc humano expresadas (por ejemplo, genbank CD709370, CD707373) y V_L de la línea germinal (por ejemplo, IGLV7-46, IGLV8-61) se consideraron en el diseño de regiones estructurales de cadena ligera.

[0229] Las diferencias de aminoácidos entre las cadenas pesadas de la región estructural humanizada candidata y el dominio variable de cadena pesada y los dominios variables de cadena ligera del anticuerpo 52M51 del anticuerpo monoclonal murino parental se evaluaron por importancia probable, y se tomó una decisión en cuanto a si cada diferencia en la posición contribuye al plegamiento y función apropiada del dominio variable. Este análisis se guió por el examen de estructuras cristalinas resueltas de otros fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, la estructura de Fab 2E8 como se describe en Trakhanov y col., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28, así como otras estructuras cristalinas de proteína (por ejemplo, estructuras del banco de datos de proteínas 1ADQ y 1GIG)). Las estructuras se modelaron usando software informático que incluyó Jmol, quick PDB y Pymol. Se considera el posible impacto de un aminoácido en una posición dada en el empaquetamiento de la región estructural de hoja β, la interacción entre los dominios variables de la cadena pesada y ligera, el grado de exposición al disolvente de la cadena lateral de aminoácidos y la probabilidad de que un aminoácido afecte la colocación de los bucles de CDR. A partir de este análisis, se concibieron y sintetizaron químicamente nueve cadenas de V_H candidatas fusionadas en marco con la región constante de IgG2 humana y ocho cadenas de V_L candidatas fusionadas en marco con la región constante de IGLC1 humana. Las cadenas pesadas candidatas comprenden: i) una región estructural sintética diseñada para asemejarse a las regiones estructurales humanas naturales y ii) las CDR del anticuerpo murino 52M51 parental.

[0230] Se probó la funcionalidad de cada cadena pesada y ligera humanizada de variante candidata por co-transfección en células de mamífero. Cada una de las nueve cadenas pesadas de 52M51 humanizadas candidatas descrita anteriormente se co-transfectó en células HEK 293 con el ADNc de la cadena ligera de 52M51 murino, y se ensayó el medio de acondicionamiento por ELISA para la actividad de unión de Notch1. Se seleccionó la variante de la cadena pesada de 52M51 que mostró la unión más robusta. Esta variante "52M51-H4" (SEQ ID N°: 22) contiene, además de las CDR murinas, variación en las 3 posiciones de la región estructural dentro de la región estructural de V_H, las posiciones de Kabat 20, 48 y 71 en comparación con una región estructural humana de ejemplo (por ejemplo, IGHV1-24). La cadena pesada humanizada de 52M51-H4 se co-transfectó a continuación en las células HEK293 con cada una de las ocho cadenas ligeras humanizadas candidatas, y el medio de acondicionamiento se ensayó de nuevo para la unión de antígeno por ELISA. Se encontró que dos variantes de la cadena ligera "2M51 L3" (SEQ ID N°: 26) y "52M51 L4" (SEQ ID N°: 30) mostraron mejor unión que los otros candidatos y se eligieron para un estudio adicional. La variante 52M51-L3 contiene, además de las CDR murinas, variación en 1 posición de la región estructural en la posición 49 de Kabat en comparación con una región estructural humana de ejemplo (por ejemplo, IGLV7-46). Se desarrollaron dos anticuerpos de variante humanizados, 52M51H4L3 y 52M51H4L4. 52M51H4L3, como se codifica por el ADN depositado en la ATCC, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008, y número de designación asignado PTA-9549.

[0231] Las afinidades por Notch1 humano y de ratón se determinaron usando un instrumento Biacore 2000. Brevemente, las proteínas Notch1 humanas y de ratón recombinantes se inmovilizaron sobre un chip CM5 usando química basada en aminas estándar (NHS/EDC). Se inyectaron diferentes concentraciones del anticuerpo sobre las superficies de la proteína y se recogieron datos cinéticos con el tiempo. Los datos se ajustaron usando la ecuación de ajuste global simultáneo para producir las constantes de disociación (K_D, nM) para cada Notch1 (Tabla 2).

Tabla 2

Constantes de disociación de IgG (K _D)		
Anticuerpo	Notch1 humano (nM)	Notch1 de ratón (nM)
52M51	2,86	NB
52M51H4L3	4,33	NB
52M51H4L4	7,35	NB

5 Ejemplo 3

Señalización del receptor Notch

[0232] En ciertas realizaciones, se determinó la capacidad de los anticuerpos del receptor Notch1 para bloquear la señalización de Notch mediada por ligando. En ciertas realizaciones, células HeLa modificadas para expresar en exceso Notch1 (Notch1-HeLa) cultivadas en DMEM complementado con antibióticos y 10 % de SBF se co-transfectaron con 1) luciferasa de luciérnaga pGL4 8X CBS que contenía un promotor sensible a Notch aguas arriba de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga para medir los niveles de señalización de Notch en respuesta al ligando DLL4; y 2) un indicador de luciferasa Renilla (Promega; Madison, WI) como control interno para la eficacia de transfección. Se añadieron células transfectadas a placas de cultivo recubiertas durante la noche con 200 ng/pocillo de proteína hDLL4-fc, y a continuación se añadieron los anticuerpos para Notch1 al medio del cultivo celular. Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se midieron los niveles de luciferasa usando un kit de ensayo de luciferasa doble (Promega; Madison, WI) con actividad de luciferasa de luciérnaga normalizada para la actividad de luciferasa Renilla. Así se determinó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la activación de la ruta de Notch1. Los anticuerpos 52M51, 52M63, 52M74 y 52M80, generados contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de un Notch1 humano (Fig. 1A) redujeron significativamente la actividad de luciferasa indicativa de señalización de Notch1 reducida en comparación con otros anticuerpos Notch1 (Fig. 1B). Además, una variante humanizada del anticuerpo 52M51, la variante 52M51 H4/L3, mostró una potencia similar en reducir la actividad de luciferasa (Fig. 1C).

25

Activación del receptor Notch y formación de IDC

[0233] La escisión de los receptores Notch por furina, ADAM y gamma-secretasa produce la formación del dominio intracelular (ICD) de Notch que a continuación desencadena la señalización de Notch aguas abajo en el núcleo. En ciertas realizaciones, la capacidad de los anticuerpos del receptor Notch1 para bloquear la activación del receptor mediada por ligando se determinó por análisis de transferencia Western. Se cultivaron células Notch1-HeLa en cultivo en suspensión en medio 293-SMII (Gibco). Las células cultivadas se transfirieron a placas de 96 pocillos en las que pocillos seleccionados se habían recubierto previamente con la proteína de fusión DLL4-fc humana (2 µg/ml) en DMEM más 2 % de SBF y MG132 1 µM (Calbiochem). Los anticuerpos que iban a generarse contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano se añadieron al medio de cultivo celular, y las células se incubaron a 37 °C durante cinco horas. A continuación, los pocillos se aspiraron y las células se volvieron a suspender en 2X tampón de electroforesis SDS. Las muestras se sonicaron a temperatura ambiente, y a continuación se sometieron a SDS-PAGE y análisis de transferencia Western usando un anticuerpo específico para el ICD de Notch1 escindido según las recomendaciones del fabricante (Cell Signaling Technology). 52M51 junto con 52M63, 52M74 y 52M80 inhibieron todos significativamente la generación del ICD después de la estimulación del ligando (Fig. 1D).

Ejemplo 4

45 Prevención *in vivo* del crecimiento tumoral usando anticuerpos del receptor anti-Notch de la región de unión no de ligando

[0234] Se prepararon células tumorales de una muestra de paciente que se había sometido a pases como un xenoinjerto en ratones para inyección en animales experimentales. Los tumores se establecieron en OncoMed Pharmaceuticals adheriéndose a los procedimientos descritos previamente (véase A1-Hajj y col., 2003; Dalerba y col., 2007) e incluyen: UM-PE13 y T3 (células de carcinoma de mama), OMP-C9, OMP-C8, OMP-C6 y Colo-205 (células de tumor de colon); y OMP-PN4 (células de carcinoma pancreático). Se extirpó tejido tumoral bajo condiciones estériles, se cortó en trozos pequeños, se trituró completamente usando cuchillas estériles, y se obtuvieron suspensiones unicelulares por digestión enzimática y rotura mecánica. Los trozos de tumor resultantes se

mezclaron con colagenasa III ultra-pura en medio de cultivo (200-250 unidades de colagenasa por ml) y se incubaron a 37 °C durante 3-4 horas pipeteando arriba y abajo mediante una pipeta de 10 ml cada 15-20 min. Las células digeridas se filtraron a través de una malla de nailon de 45 µl, se lavaron con RPMI/20 % de SBF y lavaron dos veces con HBSS. A continuación, las células tumorales disociadas se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID a las 6-8 semanas para provocar el crecimiento tumoral. Para células de tumor de mama UM-PE13 y T3, se inyectaron 50.000 células en 100 µl en el pániculo adiposo mamario derecho (n=20) junto con el implante de un gránulo de estrógeno. Para las células de tumor de colon OMP-C9, se inyectaron 50.000 células en 100 µl en la región del costado derecho (n=20). Para las células de tumor de colon OMP-C8, se inyectaron 10.000 células en 100 µl en el área del costado derecho (n=10). Para las células de tumor de colon OMP-C6, se inyectaron 10.000 células en 100 µl en el costado derecho (n=10). Todas las células tumorales se inyectaron en una mezcla de PBS (sin magnesio o calcio) y BD Matrigel (BD Biosciences) a una relación de 1:1.

[0235] Tres días después de la inyección de células tumorales, se inició el tratamiento con anticuerpo. Cada animal inyectado recibió 10 mg/kg de anticuerpos anti-Notch1 o PBS como control intraperitoneal (i.p.) dos veces por semana durante un total de 6 a 8 semanas. Los animales inyectados con células PE13 recibieron inyecciones en el pániculo adiposo mamario superior derecho, además de inyecciones de gránulos de estrógeno. Los animales inyectados con las células C9, C8 o C6 recibieron inyecciones en el cuadrante inferior derecho del abdomen. El tamaño del tumor se evaluó dos veces a la semana.

[0236] En ciertas realizaciones, se probaron anticuerpos contra una región proximal de la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano para un efecto en la formación de tumores de mama. Se implantaron subcutáneamente células de tumor de mama PE13 (50.000 células por inyección) en los pániculos adiposos mamaros. Dos días tras el implante de las células, los animales se trataron con tanto el anticuerpo de control como anticuerpos 52M, 52M1, 52M2 y 52M8 (que no tenían capacidad de señalización de anti-Notch, véase la Fig. 1B) a 10 mg/kg dosificado i.p. dos veces por semana. El tratamiento con anticuerpos del inhibidor no de Notch1 no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral en comparación con los animales tratados con control (Fig. 2C y 2D). En ciertas realizaciones, los animales inyectados con células de tumor de mama PE13 se tratan con tanto anticuerpo de control como 52M51 a 10 mg/kg dosificados i.p. dos veces por semana. El volumen tumoral se mide dos veces a la semana, y se determina el efecto de 52M51 sobre el crecimiento del tumor de mama.

[0237] En realizaciones alternativas, las células tumorales disociadas se clasifican primero en células tumorigénicas y no tumorigénicas basándose en los marcadores de la superficie celular antes de la inyección en animales experimentales. Específicamente, las células tumorales disociadas como se ha descrito anteriormente se lavan dos veces con solución de salina tamponada de HEPES (HBSS) que contiene 2 % de suero bovino inactivado con calor (HICS) y se vuelven a suspender a 10⁶ células por 100 µl. Se añaden los anticuerpos y las células se incuban durante 20 min sobre hielo seguido de dos lavados con HBSS/2 % de HICS. Los anticuerpos incluyen anti-ESA (Biomed, Foster City, CA), anti-CD44, anti-CD24 y los marcadores de linaje anti-CD2, -CD3, -CD10, -CD16, -CD18, -CD31, -CD64 y -CD140b (denominados en conjunto Lin; PharMingen, San José, CA). Los anticuerpos se conjugaron directamente con fluorocromos para seleccionar positiva o negativamente las células que expresan estos marcadores. Se eliminaron células de ratón seleccionando contra células H2Kd+, y se eliminaron células muertas usando el colorante de viabilidad 7AAD. Se realiza citometría de flujo en un FACSVantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se usan perfiles de la difusión lateral y la difusión directa para eliminar los coágulos de células. A continuación se inyectan células tumorigénicas ESA+, CD44+, CD24-/baja, Lin subcutáneamente en ratones NOD/SCID para provocar el crecimiento tumoral.

Ejemplo 5

Tratamiento *in vivo* de tumores usando anticuerpos del receptor anti-Notch1

[0238] Se prepararon células tumorales de una muestra de paciente (biopsia de tumor sólido o efusión pleural) que se había sometido a pases como un xenoinjerto en ratones para volver a someterlas a pases en animales experimentales. Se extirpó tejido tumoral, se cortó en trozos pequeños, se trituró completamente usando cuchillas estériles, y se obtuvieron suspensiones unicelulares por digestión enzimática y rotura mecánica. A continuación, las células tumorales disociadas se inyectaron subcutáneamente en los pániculos adiposos mamaros, para tumores de mama, o en el costado, para tumores no de mama, de ratones NOD/SCID para provocar el crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, las células tumorigénicas ESA+, CD44+, CD24-/baja, Lin se aislaron como se ha descrito en detalle anteriormente y se inyectaron.

[0239] En ciertas realizaciones, se implantaron subcutáneamente células de tumor de colon C8 recién

aisladas (225 células por animal) en ratones NOD/SCID. Tras la inyección de las células tumorales, los animales se monitorizaron para el crecimiento tumoral. Se dejó que los tumores crecieran durante 48 días hasta que alcanzaron un tamaño promedio de aproximadamente 210 mm³ y se distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos (n=10 por grupo). Los animales se trataron con tanto anticuerpo de control como anticuerpo que se une a la región proximal de la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano, 52M51 (10 mg/kg) dosificado i.p dos veces por semana. El tamaño del tumor se evaluó en los días 55, 57 y 62. Los animales tratados con 52M51 mostraron una inhibición estadísticamente significativa (p=0,0006) del crecimiento tumoral en comparación con los animales tratados con control (Fig. 2A y 2B).

10 **[0240]** En el punto final de tratamiento con anticuerpo, los tumores se recogen para análisis adicional. En algunas realizaciones, se analiza una porción del tumor por inmunofluorescencia para evaluar la penetración del anticuerpo en el tumor y la respuesta del tumor. Se congela instantáneamente una porción de cada tumor recogido de los ratones tratados con el receptor anti-Notch1 y tratados con el anticuerpo de control en nitrógeno líquido, se incorpora en O.C.T. y se corta en un criostato como secciones de 10 um sobre portaobjetos de vidrio.

15 Alternativamente, una porción de cada tumor se fija en formalina, se incorpora en parafina y se corta sobre un micrótopo como secciones de 10 um sobre portaobjetos de vidrio. Las secciones de se fijan posteriormente y se incuban con anticuerpos marcados con cromóforo que reconocen específicamente anticuerpos inyectados para detectar los anticuerpos del receptor anti-Notch1 y de control presentes en la biopsia del tumor. Además, pueden usarse anticuerpos que detectan tipos de células tumorales y de células reclutadas por tumor diferentes, tales como,

20 por ejemplo, anticuerpos anti-VE cadherina (CD144) o anti-PECAM-1 (CD31) para detectar células endoteliales vasculares, anticuerpos anti-alfa-actina de músculo liso que detectan células de músculo liso vasculares, anticuerpos anti-Ki67 para detectar células proliferantes, ensayos TUNEL para detectar células moribundas y anticuerpos anti-fragmento Notch del dominio intracelular (ICD) para detectar la señalización de Notch para evaluar los efectos del tratamiento con anticuerpo en angiogénesis, crecimiento de tumor y morfología del tumor.

25 **[0241]** También se evalúa el efecto del tratamiento con anticuerpo del receptor anti-Notch1 en la expresión génica de células tumorales. Se extrae ARN total de una porción de cada tumor recogido de ratones tratados con anticuerpo para Notch1 y tratados con anticuerpo de control y se usa para RT-PCR cuantitativa. Se analizan los niveles de expresión de Notch1, los componentes de la ruta de señalización de Notch que incluyen, además de la adición de marcadores de células madre cancerígenas previamente identificados que incluyen, por ejemplo CD44,

30 con relación al gen de mantenimiento GAPDH como control interno. Así se determinan los cambios en la expresión génica de células tumorales tras el tratamiento con el anticuerpo del receptor Notch1.

[0242] Además, se evaluó el efecto del tratamiento con el anticuerpo del receptor anti-Notch1 en presencia de células madre cancerígenas en un tumor. Se cortan en trozos pequeños muestras de tumores de ratones tratados con Notch1 contra tratados con anticuerpo de control, se trituran completamente usando cuchillas estériles, y se obtienen suspensiones unicelulares por digestión enzimática y rotura mecánica. A continuación se analizan las células tumorales disociadas por análisis FACS para la presencia de células madre cancerígenas tumorigénicas con basándose en la expresión del marcador de células de superficie ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin como se ha

40 descrito en detalle anteriormente.

[0243] A continuación puede evaluarse la tumorigenicidad de las células aisladas basándose en la expresión de ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin tras el tratamiento con el anticuerpo anti-Notch1. Se vuelven a inyectar subcutáneamente 5.000, 1.000, 500 y 100 células madre cancerígenas aisladas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin de ratones tratados con anticuerpo para Notch1 contra tratados con anticuerpo de control en los panículos adiposos mamarios de ratones NOD/SCID. Así se determina la tumorigenicidad de las células madre cancerígenas basándose en el número de células inyectadas requerido para la formación de tumor consistente.

45

[0244] A diferencia de la eficacia *in vivo* de 52M51, un anticuerpo que inhibe la señalización de Notch1, en un modelo de xenoinjerto de colon descrito anteriormente, se encontró que ciertos otros anticuerpos que reconocen la región proximal de la membrana de Notch1, pero no inhiben la señalización de Notch1, no tenían eficacia antitumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de mama. Los anticuerpos 52M1, 52M2 y 52M8, cada uno de los cuales se ha encontrado que no inhibe apreciablemente la señalización de Notch (Ejemplo 3 y Figura 1B), se inyectaron en ratones NOD/SCID que habían sido previamente inyectados con células de tumor de mama PE13. Cada uno de los anticuerpos 52M1, 52M2, y 52M8 dejó de afectar el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto cuando se comparó con los animales tratados con control (Figura 2C (52M1, 52M2) y Figura 2D (52M8)).

55

Ejemplo 6

Tratamiento de cáncer humano usando anticuerpos del receptor anti-Notch

[0245] Este ejemplo describe procedimientos de tratamiento de cáncer usando anticuerpos contra un receptor Notch para elegir como diana tumores que comprenden células madre cancerígenas y/o células tumorales en los 5 que se ha detectado la expresión del receptor Notch.

[0246] La presencia de la expresión del marcador de células madre cancerígenas puede primero determinarse de una biopsia de tumor. Se extirpan células tumorales de una biopsia de un paciente diagnosticado con cáncer bajo condiciones estériles. En algunas realizaciones, la biopsia de tumor se congela fresca en nitrógeno líquido, se 10 incorpora en O.C.T. y se corta sobre un criostato como secciones de 10 μm sobre portaobjetos de vidrio. Alternativamente, la biopsia de tejido se fija con formalina, se incorpora en parafina y se corta sobre un micrótopo como secciones de 10 μm sobre portaobjetos de vidrio. Las secciones se incuban con anticuerpos contra un receptor Notch para detectar la expresión de la proteína. Adicionalmente, puede determinarse la presencia de células madre cancerígenas. Se cortan muestras de la biopsia de tejido en trozos pequeños, se trituran 15 completamente usando cuchillas estériles, y las células se someten a digestión enzimática y rotura mecánica para obtener una suspensión unicelular. A continuación, las células tumorales disociadas se incuban con los anticuerpos anti-ESA, -CD44, -CD24, -Lin y -Notch1 para detectar células madre cancerígenas, y se determina la presencia de células madre de tumor ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, Notch+ por citometría de flujo como se ha descrito en detalle anteriormente.

20 **[0247]** Se trataron pacientes con cáncer cuyos tumores se diagnostican como que expresan un receptor Notch con anticuerpos del receptor anti-Notch. Los anticuerpos del receptor anti-Notch monoclonales humanizados o humanos generados como se ha descrito anteriormente se purifican y se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable en PBS para inyección. Los pacientes se tratan con los anticuerpos para Notch una 25 vez por semana durante al menos 10 semanas, pero en ciertos casos una vez por semana durante al menos aproximadamente 14 semanas. Cada administración del anticuerpo debe ser una dosis farmacéuticamente eficaz de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml y en ciertos casos entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mg/ml. El anticuerpo puede administrarse antes de, simultáneamente a, o después de los ciclos de radioterapia estándar o ciclos de quimioterapia usando uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como oxaliplatino, 30 fluorouracilo, leucovorina o estreptozocina. Se monitorizan los pacientes para determinar si tal tratamiento ha producido una respuesta antitumoral, por ejemplo, basándose en la regresión del tumor, reducción en las incidencias de nuevos tumores, menor expresión del antígeno tumoral, disminución de los números de células madre cancerígenas, u otros medios de evaluación del pronóstico de la enfermedad.

35 **Ejemplo 7**Estudios adicionales de tratamiento *in vivo* de tumores usando anticuerpos del receptor anti-Notch1

[0248] En una realización, se inyectaron subcutáneamente células de melanoma M2 (10.000) en ratones 40 NOD-SCID. Se dejó que los tumores crecieran durante 35 días hasta que alcanzaron un volumen de aproximadamente 110 mm^3 . Los ratones con tumores se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos ($n=10$) y se trataron con tanto anticuerpo de control como el anticuerpo anti-Notch1 52R43. Los anticuerpos se dosificaron dos veces a la semana a 10 mg/kg. Se midieron volúmenes del tumor en los días indicados. Como se muestra en la Figura 3A, el tratamiento anti-Notch1 con 52R43 redujo el crecimiento tumoral con respecto al grupo de control 45 ($p=0,02$).

[0249] En una realización, se inyectaron subcutáneamente células de tumor de pulmón Lu24 (30.000) en ratones NOD-SCID. Se dejó que los tumores crecieran durante 35 días hasta que alcanzaron un volumen de aproximadamente 205 mm^3 . Los ratones con tumores se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos ($n=8$) y se 50 trataron con tanto anticuerpo de control como el anticuerpo anti-Notch1 52R43. Los anticuerpos se dosificaron dos veces a la semana a 10 mg/kg. Se midieron los volúmenes del tumor en los días indicados. Como se muestra en la Figura 3B, el tratamiento anti-Notch1 con 52R43 redujo el crecimiento tumoral con respecto al grupo de control ($p=0,04$).

55 **[0250]** En una realización, se inyectaron subcutáneamente células de tumor pancreático PN8 (50.000) en ratones NOD-SCID. Se dejó que los tumores crecieran durante 27 días hasta que alcanzaron un volumen de aproximadamente 115 mm^3 . Los ratones con tumor se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos ($n=8$) y se trataron con tanto anticuerpo de control como el anticuerpo anti-Notch1 52R43. Los anticuerpos se dosificaron dos veces a la semana a 10 mg/kg. Se midieron los volúmenes del tumor en los días indicados. Como se muestra en la

Figura 3C, el tratamiento anti-Notch1 con 52R43 redujo el crecimiento tumoral con respecto al grupo de control ($p=0,005$).

[0251] En una modalidad, las células de tumor de mama TI (300.000) se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD-SCID. Se dejó que los tumores crecieran durante 27 días hasta que alcanzaron un volumen de aproximadamente 130 mm^3 . Los ratones con tumores se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos ($n=10$) y se trataron con tanto anticuerpo de control como el anticuerpo anti-Notch1 52R43, taxol, o una combinación de 52R43 y taxol. Los anticuerpos se dosificaron una vez a la semana a 15 mg/kg y el taxol se dosificó una vez a la semana a 12 mg/kg . Se midieron los volúmenes del tumor en los días indicados. Como se muestra en la Figura 3D, el tratamiento anti-Notch1 con 52R43 redujo el crecimiento tumoral con respecto al grupo de control ($p<0,0001$), y el grupo de combinación se redujo con respecto a taxol solo ($p=0,001$)

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCCAG
 GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
 TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAC TAGTAAC TACGCCAACTGGGTCCAAGAAAA
 CCTGATCATTTATTCAGTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGT
 GGAGGAACCAAAGTACTGCTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTT
 CCACCTTCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGAT
 TTCTACCCAGGTGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGT
 ATGGAGACAACCCAGCCTTCCAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTG
 ACCCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACTCATGAA
 GGTCACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGACTGTTCCCTAG

5 SEQ ID NO:4

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 52M51 (la secuencia señal putativa está subrayada)

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEK
 PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVG
 GGTKLTVLQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG
 METTQPSKQSNNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS

10

SEQ ID NO:5

Secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51 (la secuencia señal putativa está subrayada)

15

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCCAG
 GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
 TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAC TAGTAAC TACGCCAACTGGGTCCAAGAAAA
 CCTGATCATTTATTCAGTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGT
 GGAGGAACCAAAGTACTGCTCCTAGGC

SEQ ID NO:6

20 Secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51 (la secuencia señal putativa está subrayada)

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK
PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG

SEQ ID NO:7

5 Secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51 sin secuencia señal putativa

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTC
ACTTGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACACTAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAA
AAACCTGATCATTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTT
CCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCA
CAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTC
GGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCCTAGGC

10

SEQ ID NO:8

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51 sin secuencia señal putativa

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGV
15 PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO:9

20 Secuencia de polinucleótidos de la cadena pesada de 52M51 (la secuencia señal putativa está subrayada)

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
 TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
 GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT
 GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT
 AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA
 GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAAC
 TCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC
 TGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGAC
 CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTC
 ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGG
 GATTGTGGTTGTAAGCCTTGACATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTC
 CCCCCAAGCCCAAGGATGTCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTG
 GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAG
 GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTC
 AGTGAAGTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTC
 AACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATATCCAAAACCAAAGGCAGACCG
 AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTC
 AGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATAACAGTGGAGTGGCAGTGG
 AATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCATCATGAACACGAATGGCTCT
 TACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTC
 ACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATCTGAGAAGAGCCTCTCCCAC
 TCTCCTGGTAAATGA

SEQ ID NO:10

5 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 52M51 (la secuencia señal putativa está subrayada)

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
GHGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
NYGYYAMDYWGQGSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT
WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPR
DCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE
VHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRP
KAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGS
YFVYSKLNQVQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

SEQ ID NO:11

- 5 Secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51 (la secuencia señal putativa está subrayada)

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCAG
GTT CAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT
GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG
CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT
AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA

10 SEQ ID NO:12

- Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51 (la secuencia señal putativa está subrayada)

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
GHGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
15 NYGYYAMDYWGQGSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT

SEQ ID NO:13

- 20 Secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51 sin secuencia señal putativa

CAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
TCCTGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGG
CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAACCTGGGAGAACTAACTAC
AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAAC
ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGAT
GGTAACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCC
TCA

SEQ ID NO:14

5 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51 sin secuencia señal putativa

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRPGHGLEWIGQILPGTGRTNY
NEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQSSVTVS
SA

SEQ ID NO: 15

10 CDR1 de la cadena pesada de 52M51

RGYWIE

15 SEQ ID NO: 16

CDR2 de la cadena pesada de 52M51

QILPGTGRTNYNEKFKG

20 SEQ ID NO: 17

CDR3 de la cadena pesada de 52M51

25 FDGNYGYYAMDY

SEQ ID NO: 18

CDR1 de la cadena ligera de 52M51

30 RSSTGAVTTSNYAN

SEQ ID NO: 19

35 CDR2 de la cadena ligera de 52M51

GTNNRAP

SEQ ID NO: 20

40 CDR3 de la cadena ligera de 52M51

ALWYSNHWVFGGGTKL

Secuencias de 52M51 humanizadas:

[0254]

5 SEQ ID NO:21

Secuencia de polinucleótidos de la cadena pesada de 52M51-H4 (secuencia señal putativa subrayada)

10

ATGGATTGGACATGGAGGGTGTTCCTGCCTCCTCGCTGTGGCTCCTGGAGTCCTGAGCCAG
GTCCAGCTCGTCCAGAGCGGGGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGCGCTAGCGTCAAAATCAGC
TGTAAGGTCAGCGGATACACACTGAGGGGATACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCA
GGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCCAGATCCTGCCTGGAACCGGAAGGACAAATTACAAT
GAGAAGTTTAAGGGAAGGGTCACAATGACAGCAGACACAAGCACAGACACAGCTTATATG
GAACTCAGCTCCCTCAGATCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGTGCCAGGTTTCGATGGA
AATTACGGATACTATGCCATGGATTACTGGGGACAGGGGACAACGGTCACCGTGAGCTCA
GCCAGCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAActCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCAAACCÇAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
GTGGTCAGCGTCTCACC GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:22

15 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 52M51-H4 (secuencia señal putativa subrayada)

ES 2 531 541 T3

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
GKGLEWIGQILPGTGRRTNYNEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCARFDG
NYGYAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT P PMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:23

5 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51-H4 (secuencia señal putativa subrayada)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
GKGLEWIGQILPGTGRRTNYNEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCARFDG

NYGYAMDYWGQGT TTVTVSSA

10 SEQ ID NO:24

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51-H4 sin secuencia señal putativa

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRRTNY
NEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCARFDGNYGYAMDYWGQGT TTVTVS

15 SA

SEQ ID NO:25

Secuencia de polinucleótidos de la cadena ligera de 52M51-L3 (la secuencia señal putativa está subrayada)

20

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
GGAGTGGATAGCCAGGCCGTCGTCACACAGGAACCTAGCCTCACCGTTAGCCCTGGAGGA
ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
TGGTTCCAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
GCTCCCGGAGTCCCGCCAGGTTCTCCGGCTCCCTCCTGGGTGGCAAGGCTGCTCTGACA
CTCAGCGGTGCCAGCCAGAGGATGAAGCGGAGTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
CATTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAAGGCAACCCTCGTC
TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTCACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC
CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

SEQ ID NO:26

5 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 52M51-L3 (la secuencia señal putativa está subrayada)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
PVKVGVEVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC

SEQ ID NO:27

10 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51-L3 (la secuencia señal putativa está subrayada)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLG

15 SEQ ID NO:28

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51-L3 sin secuencia señal putativa

20 SGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN
RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO:29

25 Secuencia de polinucleótidos de la cadena ligera de 52M51-L4 (la secuencia señal putativa está subrayada)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
GGAGTGGATAGCCAGACCGTCGTCACACAGGAACCTAGCTTTTCCGTTAGCCCTGGAGGA
ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
TGGTATCAGCAGACTCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
GCTCCCGGAGTCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCATCCTGGGAAATAAAGCTGCTCTGACA
ATCACAGGTGCCAGGCTGACGATGAAAGCGACTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
CATTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAAGCAACCCTCGTC
TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTCACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC
CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

SEQ ID NO:30

5 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 52M51-L4 (la secuencia señal putativa está subrayada)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WYQQT PGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYICALWYSN
HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
PVKVGVEETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPAQWKS HRYSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC

SEQ ID NO:31

10

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51-L4 (la secuencia señal putativa está subrayada)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WYQQT PGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYICALWYSN
HWVFGGGTKLTVLG

15

SEQ ID NO:32

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51-L4 sin secuencia señal putativa

SGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWYQQT PGQAPRTLIGGTNN
RAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYICALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a una región proximal de la membrana de unión no de ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano, que comprende:
- 5 (a) una CDR1 de la cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID NO: 15), una CDR2 de la cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 16) y una CDR3 de la cadena pesada que comprende FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO: 17); y
- 10 (b) una CDR1 de la cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 18), una CDR2 de la cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO: 19) y una CDR3 de la cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO: 20).
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende:
- 15 (a) una región variable de la cadena pesada que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24 y una región variable de la cadena ligera que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 32; o
- 20 (b) una región variable de la cadena pesada que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14 y una región variable de la cadena ligera que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8.
3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo monovalente, un anticuerpo IgG1 o un anticuerpo IgG2.
4. El anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las mismas regiones variables de la cadena pesada y ligera que un polipéptido codificado por un plásmido depositado como la designación de depósito de patente ATCC PTA-9549.
5. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
- 35 (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 32; o
- (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 40 6. El anticuerpo según la reivindicación 5, que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.
7. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de
- 45 SEQ ID NO: 26 ó 30.
8. El anticuerpo codificado por el polinucleótido depositado en la ATCC como PTA-9549.
9. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 codificado por un polinucleótido que
- 50 comprende SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 25 ó 29.
10. Una molécula de polinucleótido aislada que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 55 11. Una célula huésped:
- (a) que produce el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; o
- (b) que comprende la molécula de polinucleótido según la reivindicación 10.

12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 13. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad.
14. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 10 15. Uso del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.
- 15 16. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso según la reivindicación 14 o el uso según la reivindicación 15, en el que el tratamiento reduce la tumorigenicidad de un tumor y/o reduce la frecuencia de células madre cancerígenas en un tumor.
17. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso según la reivindicación 14 o la reivindicación 16 o el uso según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que el cáncer está
20 seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello.
18. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso según una cualquiera de
25 las reivindicaciones 14, 16 ó 17 o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el tratamiento comprende administrar el anticuerpo, y comprende además administrar al sujeto un tratamiento adicional para el cáncer;
- 30 preferentemente en el que el tratamiento adicional para el cáncer es radioterapia, quimioterapia, o un anticuerpo terapéutico adicional.

Figura 1

1A

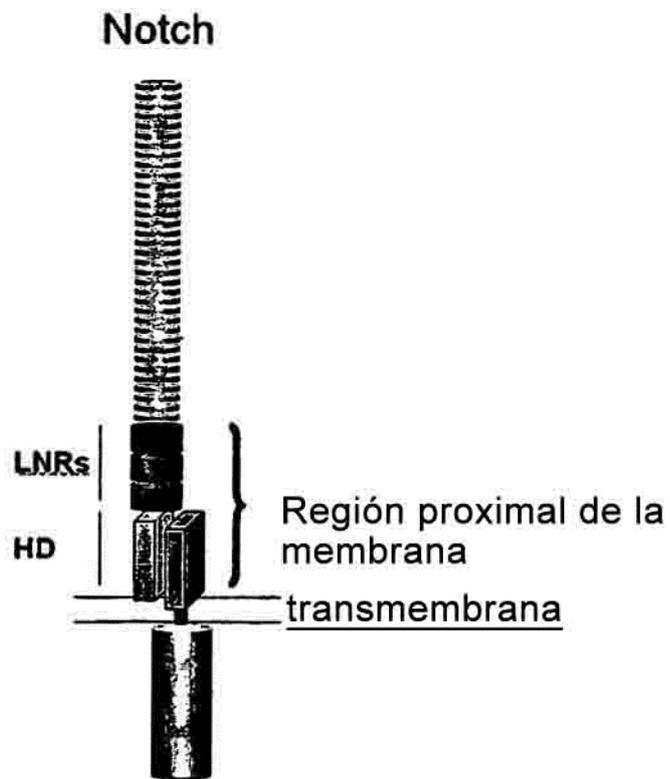
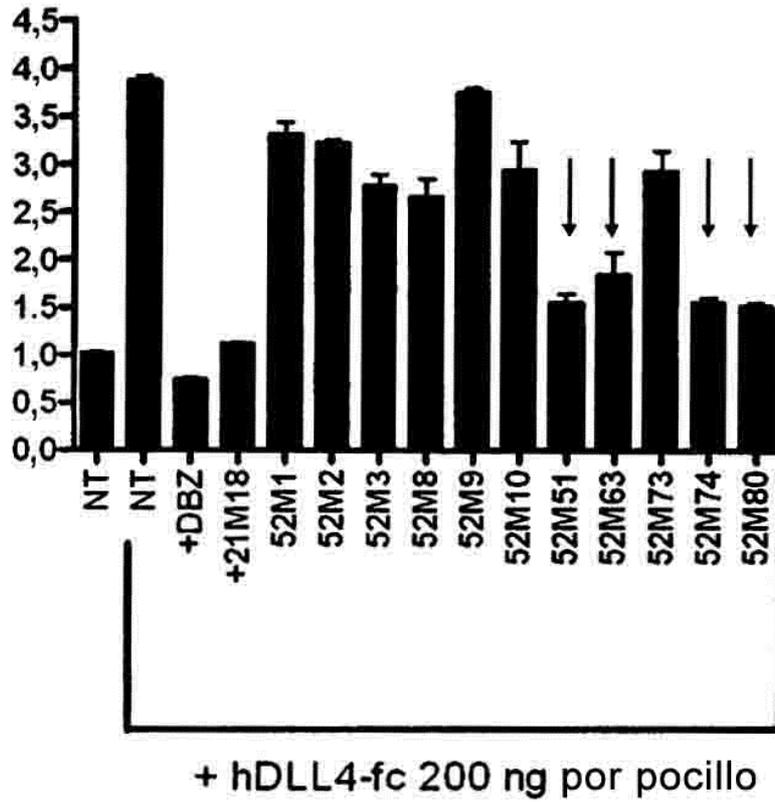


Figura 1

1B



1C

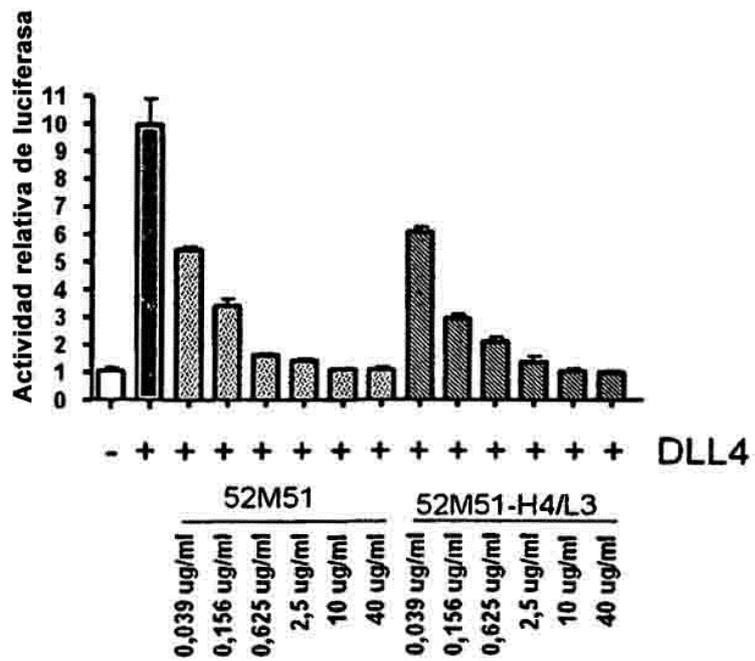


Figura 1

1D

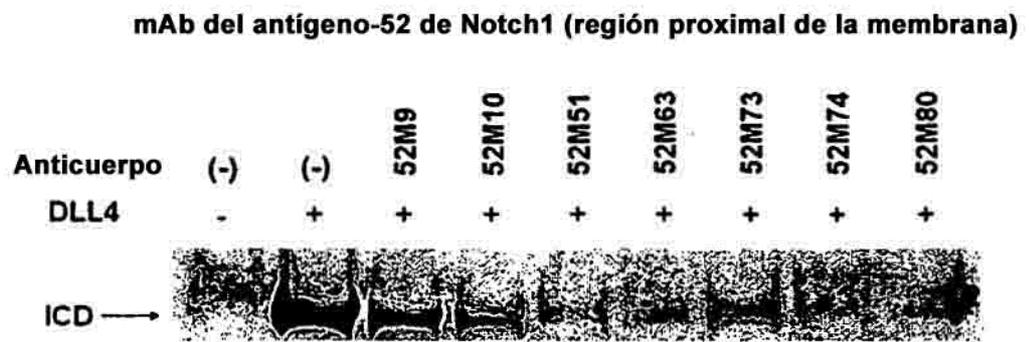
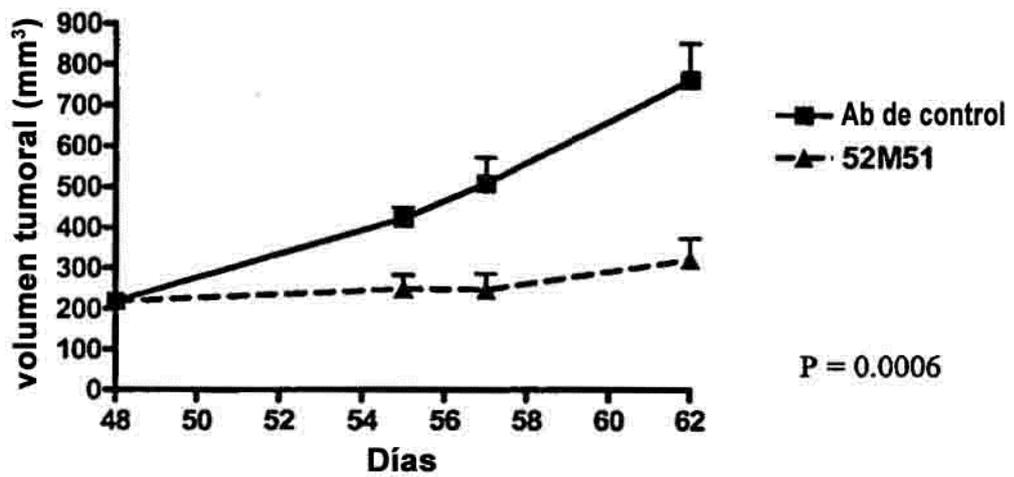


Figura 2

2A



2B

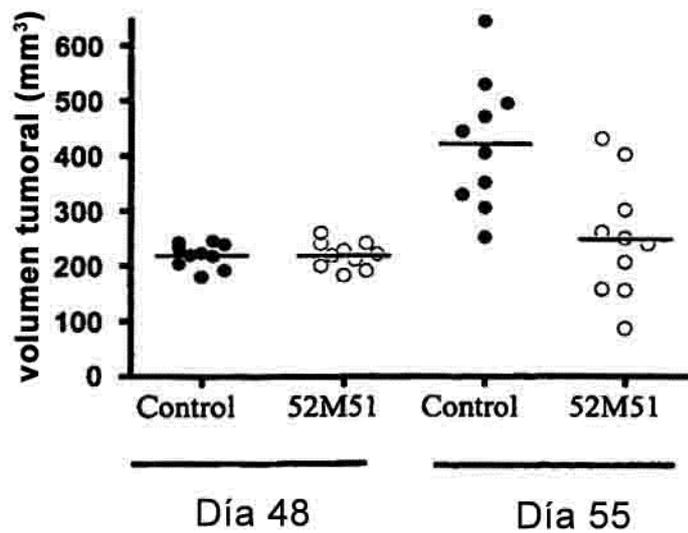
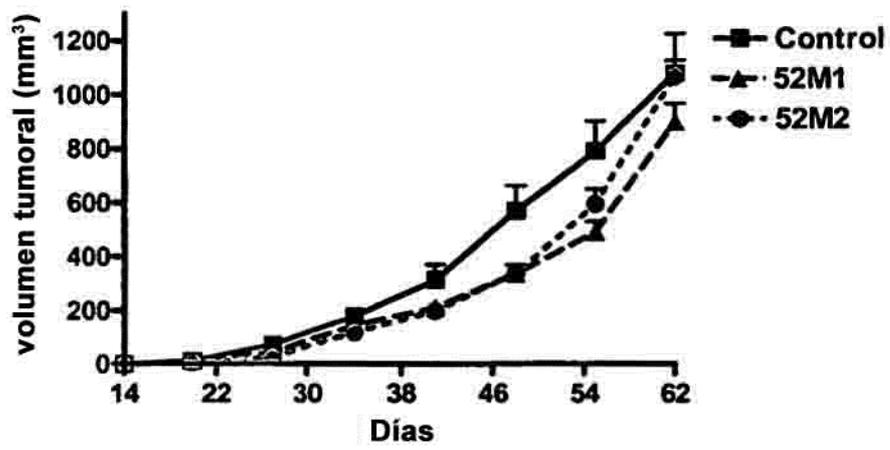


Figura 2

2C



2D

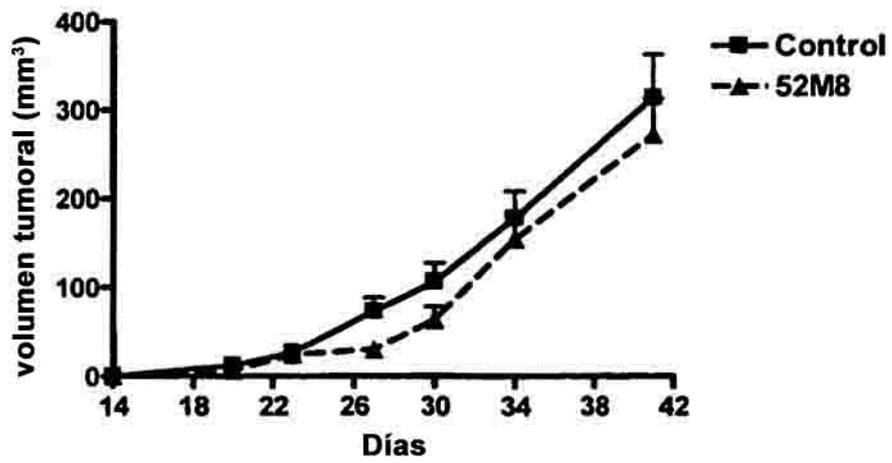
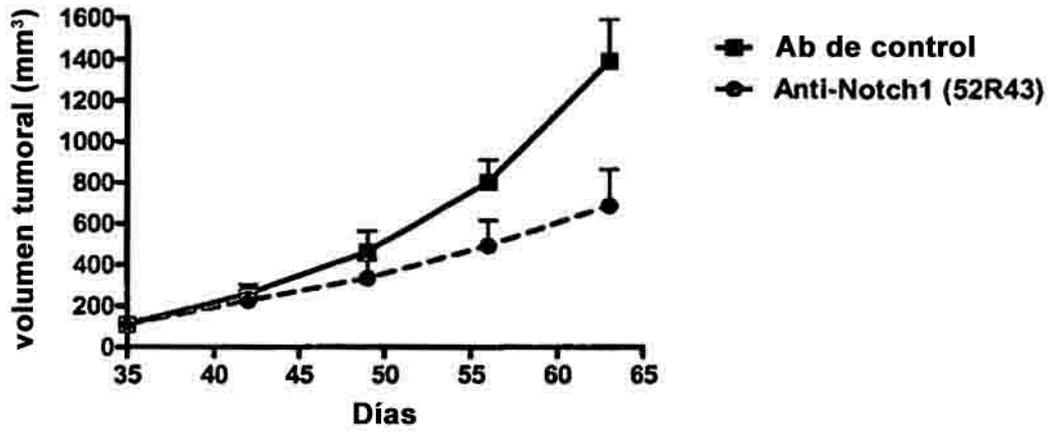


Figura 3

3A

Tumor de melanoma M2



3B

Tumor de pulmón Lu24

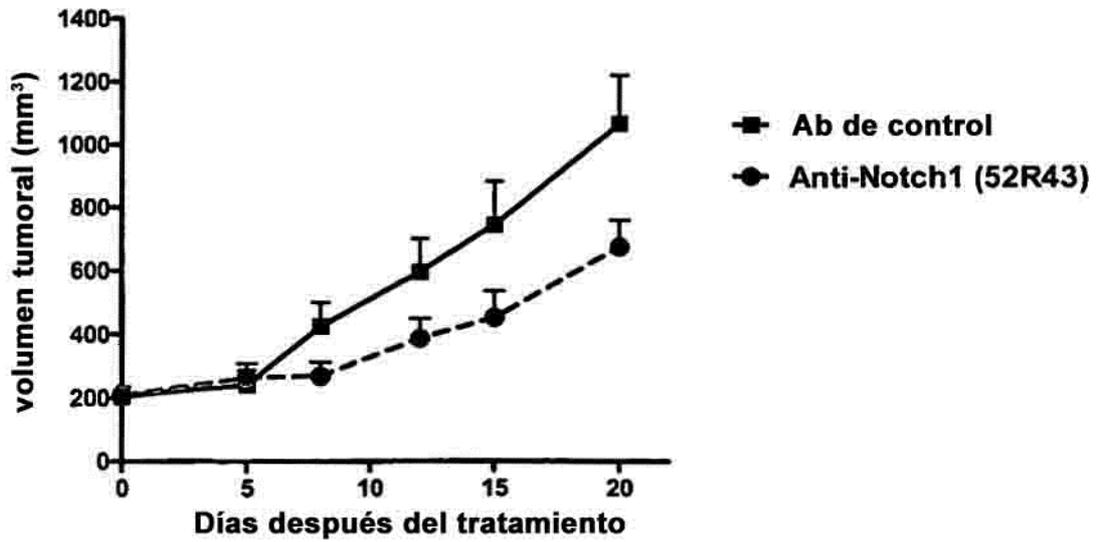
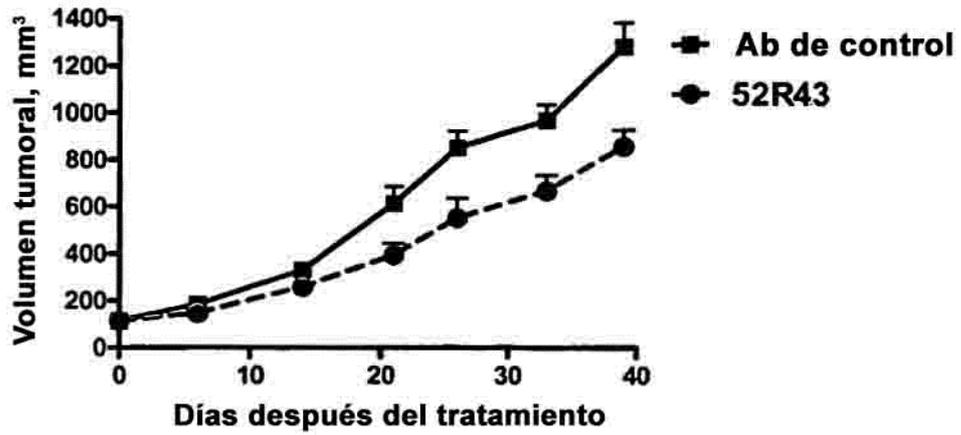


Figura 3

3C

Tumor pancreático PN8



3D

Tumor de mama T1

