

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 360**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2014** **PCT/GB2014/050407**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014** **WO14125273**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2014** **E 14705561 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 2956483**

54 Título: **Diana terapéutica y diagnóstica para el cáncer que comprende reactivos de unión a DLL3**

30 Prioridad:

12.02.2013 GB 201302447

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2021

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)**

**Binger Str. 173
55216 Ingelheim, DE**

72 Inventor/es:

HUDSON, LINDSEY JANE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 813 360 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

Diana terapéutica y diagnóstica para el cáncer que comprende reactivos de unión a DLL3

5 Introducción

La presente invención se caracteriza mediante las reivindicaciones adjuntas y se refiere a la identificación de una proteína membranal asociada a cáncer, tal como cáncer de pulmón, cáncer pancreático y/o cáncer de piel, que presenta utilidad como diana terapéutica para el tratamiento de cánceres o como marcador de cánceres. En particular, la proteína representa una diana biológica contra la que pueden producirse reactivos de afinidad, incluyendo anticuerpos terapéuticos, u otros agentes farmacéuticos. La invención se refiere además a la utilización de dichos reactivos de afinidad para el tratamiento y/o el diagnóstico de cánceres.

15 Antecedentes de la invención

Los retos principales en el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer de pulmón, el cáncer pancreático y el cáncer de piel, son la mejora de las tasas de detección precoz, a fin de encontrar nuevos marcadores no invasivos que puedan utilizarse para el seguimiento de la progresión de enfermedad y para identificar la recaída, y la identificación de terapias mejoradas y menos tóxicas, especialmente para la enfermedad avanzada, en la que la supervivencia a 5 años todavía es baja. Existe una gran necesidad de identificación de dianas que resulten más específicas a las células de cáncer, p.ej., unas que se expresen sobre la superficie de las células tumorales de manera que puedan ser atacadas por nuevos enfoques prometedores como la inmunoterapéutica y las toxinas dirigidas.

La proteína 3 de tipo delta es una proteína membranal de tipo I y es un miembro de la familia de Delta. El inventor ha mostrado que la proteína 3 de tipo delta se expresa en el cáncer, sugiriendo que las terapias basadas en afinidad dirigidas contra la proteína 3 de tipo delta en pacientes, incluyendo aquellos con cáncer, presentará un efecto terapéutico.

Los anticuerpos de DLL3 inductores de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) sobre las células de cáncer pulmonar de células pequeñas y la utilización de dichos anticuerpos solos o conjugados con un agente citotóxico para el tratamiento del cáncer han sido descritas anteriormente, en el documento nº EP2530091A1.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se caracteriza mediante las reivindicaciones adjuntas. En la presente memoria se describe además la detección de proteína 3 de tipo delta, en lo sucesivo en la presente memoria denominada DLL3, en extractos membranales de diversos tejidos enfermos, p.ej., cáncer pulmonar, cáncer pancreático y cáncer de piel, en la presente memoria denominadas 'las enfermedades de la invención'.

La expresión diferencial de DLL3 en diversos cánceres permite el reconocimiento de la proteína utilizando reactivo de afinidad, p.ej., terapias a base de anticuerpos, para dichos cánceres. De esta manera, puede utilizarse DLL3 en la generación de reactivos de afinidad, incluyendo anticuerpos, que se unen específicamente a epítopos dentro de DLL3 y pueden ser la diana de dichos reactivos de afinidad como base del tratamiento. Los reactivos de afinidad, incluyendo los anticuerpos, con diana en una proteína sobre la superficie celular de las células de cáncer pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer mediante una diversidad de mecanismos, incluyendo: (i) lisis mediante citotoxicidad celular mediada por el complemento o dependiente de anticuerpos (ADCC), (ii) lisis por fármacos o una o más toxinas conjugadas con dichos reactivos de afinidad, o (iii) inhibición de la función fisiológica de dicha proteína, que puede estar estimulando el crecimiento de las células de cáncer, p.ej., mediante rutas de señalización. Un aspecto importante de dicho tratamiento a base de reactivo de afinidad es que el perfil de expresión normal de la diana proteína, en términos de distribución en los tejidos y nivel de expresión, es tal que cualquier reconocimiento de la diana proteína sobre los tejidos normales por parte del anticuerpo no da lugar a efectos secundarios adversos por la unión a tejidos normales. En un aspecto, la invención se refiere a un reactivo de afinidad, en el que el reactivo de afinidad es un anticuerpo biespecífico tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

En la presente memoria se describe un método para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer, que comprende administrar en un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un reactivo de afinidad que se une a DLL3.

El cáncer es preferentemente una de las enfermedades de la invención.

La invención proporciona además un reactivo de afinidad que se une a DLL3 para la utilización en el tratamiento o la profilaxis del cáncer, preferentemente en el que el cáncer es una de las enfermedades de la invención.

La invención proporciona además la utilización de un reactivo de afinidad que se une a DLL3 en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la profilaxis del cáncer, preferentemente en la que el cáncer es una de las enfermedades de la invención.

Los reactivos de afinidad para la utilización en la invención preferentemente se unen específicamente a DLL3.

El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo, p.ej., un anticuerpo completo, o un fragmento funcional del mismo o un mimético de anticuerpo. Los reactivos de afinidad preferentes incluyen anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales.

El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo defucosilado o un anticuerpo biespecífico.

Entre los fragmentos de anticuerpo funcionales se incluyen un UniCuerpo, un anticuerpo de dominio o un Nanobody®.

Entre los miméticos de anticuerpo se incluyen un aficuerpo, un DARPin, una anticalina, un avímero, un Versabody o una duocalina.

Los reactivos de afinidad para la utilización en la invención pueden contener o conjugarse con una fracción terapéutica, tal como una fracción citotóxica o un isótopo radioactivo. El reactivo de afinidad puede ser un conjugado de anticuerpo-fármaco o inmunoconjugado.

El reactivo de afinidad puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o puede inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). El reactivo de afinidad puede inducir apoptosis de las células de cáncer, eliminar o reducir el número de células madre de cáncer y/o eliminar o reducir el número de células de cáncer circulantes. Los reactivos de afinidad pueden modular una función fisiológica de DLL3, inhibir la unión de ligandos a DLL3 y/o inhibir una ruta de transducción de señales mediada por DLL3.

En una realización alternativa, en la presente memoria se describe también un método para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer, que comprende administrar en un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente hibridante capaz de hibridarse con un ácido nucleico codificante de DLL3.

En la presente memoria se describe además un agente hibridante capaz de hibridarse con ácido nucleico codificante de DLL3 para la utilización en el tratamiento o la profilaxis de un cáncer, preferentemente en el que el cáncer es una de las enfermedades de la invención.

En la presente memoria se describe además la utilización de un agente hibridante capaz de hibridarse con ácido nucleico codificante de DLL3 en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la profilaxis de un cáncer, preferentemente en el que el cáncer es una de las enfermedades de la invención.

Los agentes hibridantes para la utilización tal como se indica en la presente memoria preferentemente se unen específicamente a un ácido nucleico codificante de uno o más dominios extracelulares de DLL3.

Entre los agentes hibridantes adecuados para la utilización tal como se indica en la presente memoria se incluyen ARN inhibidor, ARN interfiriente corto (ARNip), ARN de horquilla corto (ARNhc), microARN (miARN), ácido nucleico antisentido, ADN complementario (ADNc), oligonucleótidos y ribozimas.

En la presente memoria se describe además un método para detectar, diagnosticar y/o cribar o monitorizar la progresión de un cáncer en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer, o de monitorización del efecto de un fármaco o terapia para el cáncer en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer, en un sujeto que comprende detectar la presencia o nivel de DLL3 o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia o nivel de ácido nucleico codificante de DLL3 o que comprende detectar un cambio en el nivel del mismo en dicho sujeto.

Dicho método puede comprender la detección de la presencia de DLL3 o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia de ácido nucleico codificante de DLL3, en el que: (a) la presencia de un nivel elevado de DLL3 o dicho fragmento o fragmentos del mismo o un nivel elevado de ácido nucleico codificante de DLL3 en el sujeto en comparación con el nivel en un sujeto sano, o (b) la presencia de un nivel detectable de DLL3 o de dicho fragmento o fragmentos del mismo o de un nivel detectable de ácido nucleico codificante de DLL3 en el sujeto en comparación con un nivel indetectable correspondiente en un sujeto sano es indicativo de la presencia del cáncer en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer, en dicho sujeto.

En la presente memoria se describe además un método para detectar, diagnosticar y/o cribar o monitorizar la progresión de un cáncer, en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer, o de monitorización del efecto de un fármaco o terapia para el cáncer, en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer, en un sujeto que comprende detectar la presencia o el nivel de anticuerpos capaz de unión inmuno-específica a DLL3 o uno o más fragmentos del mismo.

En los métodos según la invención, la presencia de DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia de ácido

nucleico codificante de DLL3, o la presencia o nivel de anticuerpos capaces de unión inmuno-específica a DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, puede detectarse mediante el análisis de una muestra biológica obtenida del sujeto.

5 La presencia de DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, puede detectarse utilizando un reactivo de afinidad que se une a DLL3. El reactivo de afinidad puede ser cualquier reactivo de afinidad adecuado tal como se indica en la presente memoria. El reactivo de afinidad puede contener o estar conjugado con un marcaje detectable.

10 En cualquiera de los aspectos de la invención a los que se hace referencia en la presente memoria, el sujeto puede ser un ser humano.

15 En la presente memoria se describen además métodos para identificar un agente destinado al tratamiento o a la profilaxis del cáncer, en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer, en el que el método comprende: (a) poner en contacto DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, con un agente candidato, y (b) determinar si el agente se une a DLL3, o uno o más fragmentos del mismo. El método puede comprender además adicionalmente la etapa de someter a ensayo la capacidad de un agente que se une a DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, de inhibir el cáncer, en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer. El agente puede, entre otras cosas, modular una actividad de DLL3, reducir la unión de ligando a DLL3 o reducir la dimerización de DLL3.

20 En las diversas realizaciones indicadas en la presente memoria, son tipos de cáncer particulares que pueden mencionarse, las enfermedades de la invención.

En una realización, el cáncer que debe detectarse, prevenirse o tratarse es cáncer de pulmón, p.ej., cáncer de pulmonar de células no pequeñas y/o cáncer de pulmón de células pequeñas.

25 En otra realización, el cáncer que debe detectarse, prevenirse o tratarse es cáncer pancreático.

En otra realización, el cáncer que debe detectarse, prevenirse o tratarse es cáncer de piel, p.ej., melanoma.

30 Otros aspectos de la presente invención se explican posteriormente y en las reivindicaciones en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1a muestra la internalización de anticuerpos policlonales anti-DLL3 por células SHP-77, utilizando el ensayo PabZAP.

La figura 1b muestra la internalización de anticuerpos policlonales anti-DLL3 por células N82, utilizando el ensayo PabZAP.

La figura 2 muestra la lisis específica de células DMS79 expresantes de DLL3 mediante activación de células T por anticuerpos policlonales biespecíficos anti-DLL3 anti-CD3.

40 Descripción detallada de la invención

45 La invención descrita en detalle a continuación comprende la administración de composiciones terapéuticas en un sujeto, p.ej., un sujeto mamífero, para tratar o prevenir el cáncer, p.ej., enfermedades de la invención. Se describen además métodos y composiciones para el cribado, diagnóstico y pronóstico clínicos del cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, en un sujeto mamífero para identificar los pacientes que más probablemente responderán a un tratamiento terapéutico particular, para la monitorización de los resultados del cáncer, p.ej., la terapia de las enfermedades de la invención, para el cribado de fármacos y el desarrollo de fármacos.

50 La invención se basa en el resultado de que la proteína DLL3 se expresa en determinados cánceres. En particular, se adjuntan datos de respaldo en la presente memoria que demuestran la expresión de proteína DLL3 en la membrana plasmática del cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer de piel. Por lo tanto, los anticuerpos con diana en DLL3 pueden presentar utilidad como terapéuticos y diagnósticos en dichos cánceres y en otros tipos de cáncer que muestran la expresión de DLL3.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero. El sujeto mamífero puede ser un mamífero no humano, aunque generalmente es un ser humano, tal como un ser humano adulto.

60 El sujeto en general es un sujeto vivo. Sin embargo, aunque los usos, métodos y composiciones de la presente invención resultan especialmente adecuados para el cribado, diagnóstico y pronóstico de un sujeto vivo, también pueden utilizarse para el diagnóstico *post mortem* en un sujeto, por ejemplo para identificar elementos de la familia en riesgo de desarrollar la misma enfermedad.

65 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un sujeto que presenta o se sospecha que presenta una o más de las enfermedades de la invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “proteína de la invención” se refiere a una proteína 3 de tipo delta (GeneID: 10683), que en la presente memoria se denomina DLL3. Se ha encontrado que dicha proteína se expresa diferentemente en diversos cánceres, proporcionando de esta manera una nueva diana para las terapias basadas en la afinidad de dichos cánceres. Se proporciona una secuencia humana de la proteína DLL3 en SEC ID nº 1. El término DLL3 (en el contexto de una proteína) comprende proteínas cuyas secuencias de aminoácidos consisten en, o comprenden, la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 1 o derivados o variantes de la misma, particularmente derivados humanos naturales o variantes de los mismos.

Dicha proteína se ha identificado en extractos de proteína membranal de muestras de tejido canceroso procedentes de pacientes de cáncer mediante los métodos y aparatos indicados en el Ejemplo 1 (p.ej., mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas de extractos de proteínas membranales). Se compararon las secuencias peptídicas con las bases de datos SWISS PROT y TrEMBL (guardadas por el Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) y el European Bioinformatics Institute (EBI), las cuales se encuentran disponibles en www.expasy.org), y se identificó la entrada Q9NYJ7, proteína 3 de tipo delta-DLL. La secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína se encuentra en el número de acceso NM_016941, tal como se proporciona en SEC ID nº 3.

Según SWISS-PROT, la proteína 3 de tipo delta es una proteína membranal de tipo I de la familia de Delta y consiste en un dominio DSL, seis dominios de tipo EGF, una región transmembranal y una cola extracelular entre los aminoácidos 27 y 492 de la SEC ID nº 1 (SEC ID nº 12). El inventor ha mostrado que la proteína 3 de tipo delta se expresa en el cáncer, sugiriendo que las terapias basadas en afinidad dirigidas contra la proteína 3 de tipo delta en pacientes, incluyendo aquellos con cáncer, presentará un efecto terapéutico.

DLL3 resulta útil, al igual que los fragmentos, particularmente los fragmentos que contienen epítomos, p.ej., fragmentos antigénicos o inmunogénicos de los mismos y derivados de los mismos, particularmente fragmentos que comprenden dominios extracelulares (p.ej., colas o bucles extracelulares) de la proteína. Los fragmentos que contienen epítomos, incluyendo los fragmentos antigénicos o inmunogénicos, típicamente son de 12 aminoácidos o más de longitud, p.ej., de 20 aminoácidos o más, p.ej., de 50 o 100 aminoácidos o más. Los fragmentos pueden ser de 95% o más de la longitud de la proteína completa, p.ej., de 90% o más, p.ej., de 75% o 50% o 25% o 10% o más de la longitud de la proteína completa.

Alternativamente, la proteína/polipéptido utilizado o al que se hace referencia en la presente memoria puede estar limitado a aquellas proteínas/polipéptidos específicamente indicados/descritos en la presente especificación o a una variante o derivado que presenta por lo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad o similitud de secuencias de aminoácidos con el mismo. El porcentaje de identidad/similitud de secuencia puede determinarse mediante cualquier algoritmo adecuado, p.ej., BLAST, CLUSTAL, utilizando parámetros por defecto apropiados.

Por lo tanto, el término “DLL3” en el contexto de una proteína o polipéptido se refiere a una proteína o polipéptido se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos consiste en, o comprende, la secuencia de aminoácidos proporcionada en cualquiera de la SEC ID nº 1 o 2 o un derivado o variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% o 95% respecto a cualquiera de SEC ID nº 1 o nº 2, y en el que la proteína presenta esencialmente la misma distribución en los tejidos que DLL3.

En el contexto de un ácido nucleico, el término “DLL3” se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada en cualquiera de SEC ID nº 1 o nº 2, o un derivado o variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% o 95% respecto a cualquiera de SEC ID nº 1 o nº 2, y en el que la proteína presenta esencialmente la misma distribución en los tejidos que la proteína DLL3.

El término “DLL3” en el contexto de un ácido nucleico se refiere además a un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia proporcionada en cualquiera de SEC ID nº 3 o nº 4, o un derivado o variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% o 95% respecto a cualquiera de SEC ID nº 3 o nº 4 y que codifica una proteína que presenta esencialmente la misma distribución en los tejidos que la proteína DLL3.

Los fragmentos que contienen epítomos de DLL3, incluyendo los fragmentos antigénicos o inmunogénicos, serán capaces de inducir una respuesta inmunitaria relevante en el paciente. El ADN codificante de DLL3 también resulta útil, al igual que los fragmentos del mismo, p.ej., ADN codificante de fragmentos de DLL3, tal como fragmentos inmunogénicos del mismo. Los fragmentos de ácido nucleico (p.ej., ADN) codificantes de DLL3 pueden ser de 95% o más de la longitud de la región codificante completa, p.ej., 90% o más, p.ej., 75% o 50% o 25% o 10% o más de la longitud de la región codificante completa. Los fragmentos de ácido nucleico (p.ej., ADN) pueden presentar una longitud de 36 nucleótidos o más, p.ej., 60 nucleótidos o más, p.ej., 150 o 300 nucleótidos o más de longitud.

Entre los derivados de DLL3 se incluyen variantes de la secuencia en las que se ha realizado una o más (p.ej., 1 a 20, tal como 15 aminoácidos, o hasta 20%, tal como hasta 10% o 5% o 1% en número de aminoácidos respecto a la

longitud total de la proteína) deleciones, inserciones o sustituciones. Las sustituciones típicamente pueden ser sustituciones conservadoras. Los derivados típicamente presentarán esencialmente la misma función biológica que la proteína de la que se derivan. Los derivados típicamente serán comparablemente antigénicos o inmunogénicos respecto a la proteína a partir de la que se derivan. Los derivados típicamente presentan la actividad de unión a ligando, o la capacidad de formación de complejo de receptor activo, o preferentemente ambas, de la proteína a partir de la que se derivan. Los derivados y variantes generalmente presentan la misma distribución en los tejidos que DLL3.

Entre los derivados de proteínas se incluyen además proteína tratada químicamente, tal como proteínas carboximetiladas, carboxiamidadas o acetiladas, por ejemplo tratadas durante la purificación.

En un aspecto, en la presente memoria se describe DLL3 o una composición que comprende DLL3. La proteína puede encontrarse en forma aislada o purificada. En la presente memoria se describe además un ácido nucleico codificante de DLL3 y una composición que comprende un ácido nucleico codificante de DLL3.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, en la que la composición comprende un polipéptido DLL3 y/o uno o más fragmentos antigénicos o inmunogénicos del mismo, y uno o más portadores, excipientes, diluyentes o adyuvantes adecuados (los adyuvantes adecuados se comentan posteriormente).

La composición capaz de inducir una respuesta inmunitaria puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de una vacuna que comprende un polipéptido DLL3 o derivado o variante del mismo, y/o uno o más fragmentos antigénicos inmunogénicos del mismo, opcionalmente junto con uno o más portadores, excipientes, diluyentes o adyuvantes adecuados.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un polipéptido DLL3, o uno o más fragmentos o derivados o variantes del mismo, para el tratamiento o la profilaxis de, p.ej., una o más enfermedades de la invención.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe la utilización de un polipéptido DLL3, o uno o más fragmentos o derivados o variantes del mismo para el tratamiento o la profilaxis de, p.ej., una o más de las enfermedades de la invención.

En la presente memoria se describe además la utilización de un polipéptido DLL3, o uno o más fragmentos o derivados o variantes del mismo, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la profilaxis de, p.ej., una o más de las enfermedades de la invención.

En un aspecto se proporciona un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido DLL3, uno o más fragmentos, derivados o variantes del mismo, para el tratamiento o la profilaxis de, p.ej., una o más de las enfermedades de la invención.

Se proporciona además un método para el tratamiento o la profilaxis de, p.ej., las enfermedades de la invención en un sujeto, o de vacunación de un sujeto contra, p.ej., una o más de las enfermedades de la invención, que comprende la etapa de administrar en el sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido DLL3 y/o uno o más fragmentos antigénicos o inmunogénicos, o derivados o variantes del mismo, por ejemplo en forma de una vacuna.

En otro aspecto, en la presente memoria se describen métodos de tratamiento de, p.ej., las enfermedades de la invención, que comprenden administrar en el paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que modula (p.ej., regula positiva o negativamente) o complementa la expresión o la actividad biológica (o ambas) de DLL3 en pacientes que presentan, p.ej., las enfermedades de la invención, a fin de: (a) evitar la aparición o el desarrollo de, p.ej., las enfermedades de la invención, (b) prevenir la progresión de, p.ej., las enfermedades de la invención, o (c) aliviar los síntomas de, p.ej., las enfermedades de la invención.

En una realización todavía adicional, en la presente memoria se describe un medicamento que comprende, por separado o juntos:

- (a) DLL3, y
- (b) un agente anticáncer,

para la administración simultánea, secuencial o separada en el tratamiento del cáncer, preferentemente en el tratamiento de una de las enfermedades de la invención.

DLL3 puede utilizarse para la detección, pronóstico, diagnóstico o monitorización de, p.ej., las enfermedades de la invención o para el desarrollo de fármacos.

Según otro aspecto, en la presente memoria se describe un método de detección, diagnóstico y/o cribado o monitorización de la progresión de, p.ej., las enfermedades de la invención o de monitorización del efecto de, p.ej., un fármaco o terapia anticáncer dirigido a las enfermedades de la invención en un sujeto, que comprende detectar la

presencia o nivel de DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia o nivel de ácido nucleico codificante de DLL3 o la presencia o nivel de actividad de DLL3, o que comprende detectar un cambio en el nivel del mismo en dicho sujeto.

Según otro aspecto, en la presente memoria se describe un método de detección, diagnóstico y/o cribado de, p.ej., las enfermedades de la invención en un sujeto candidato, que comprende detectar la presencia de DLL3 o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia de ácido nucleico codificante de DLL3 o la presencia de la actividad de DLL3 en dicho sujeto candidato, en el que: (a) la presencia de un nivel elevado de DLL3 o dicho fragmento o fragmentos del mismo, o un nivel elevado de ácido nucleico codificante de DLL3 o la presencia de un nivel elevado de actividad de DLL3 en el sujeto candidato en comparación con el nivel en un sujeto sano, o (b) la presencia de un nivel detectable de DLL3 o dicho fragmento o fragmentos del mismo o un nivel detectable de ácido nucleico codificante de DLL3 o la presencia de un nivel detectable de actividad de DLL3 en el sujeto candidato en comparación con un nivel no detectable correspondiente en un sujeto sano indica la presencia de, p.ej., las enfermedades de la invención en dicho sujeto.

Según otro aspecto, en la presente memoria se describe un método de monitorización de la progresión de, p.ej., las enfermedades de la invención en un sujeto, o de monitorización del efecto de, p.ej., un fármaco o terapia anticáncer dirigido a las enfermedades de la invención, que comprende detectar la presencia de DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia de ácido nucleico codificante de DLL3 o la presencia de la actividad de DLL3 en dicho sujeto candidato en un primer punto temporal y en un punto temporal posterior, la presencia de un nivel elevado o reducido de DLL3 o de dicho fragmento o fragmentos del mismo o un nivel elevado o reducido de ácido nucleico codificante de DLL3 o la presencia de un nivel elevado o reducido de actividad de DLL3 en el sujeto en el punto temporal posterior en comparación con el nivel en el sujeto en dicho primer punto temporal, indicando la progresión o regresión de, p.ej., las enfermedades de la invención o indicando el efecto o no efecto de, p.ej., un fármaco o terapia anticáncer dirigido a las enfermedades de la invención en dicho sujeto.

Para DLL3, el nivel detectado obtenido tras el análisis de la muestra de tejido procedente de sujetos que presentan, p.ej., las enfermedades de la invención, respecto al nivel detectado que se obtiene tras analizar el tejido procedente de sujetos libres de, p.ej., las enfermedades de la invención, dependerán del protocolo analítico particular y la técnica de detección que se utilice. De acuerdo con lo anterior, la presente invención contempla que cada laboratorio establezca un intervalo de referencia en sujetos libres de, p.ej., las enfermedades de la invención según el protocolo analítico y técnica de detección utilizada, tal como es convencional en la técnica diagnóstica. Preferentemente, por lo menos una muestra de tejido de control positivo de un sujeto que es conocido que presenta, p.ej., las enfermedades de la invención o por lo menos una muestra de tejido de control negativo de un sujeto que es conocido que se encuentra libre de, p.ej., las enfermedades de la invención (y más preferentemente muestras de control tanto positivo como negativo) están incluidas en cada lote de muestras de ensayo analizado.

En un aspecto de la invención, el análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas u otros métodos apropiados, se utilizan para analizar las muestras de tejido de enfermedades de la invención de un sujeto, preferentemente un sujeto vivo, a fin de medir la expresión de DLL3 para el cribado o el diagnóstico de, p.ej., las enfermedades de la invención, a fin de determinar el pronóstico del paciente de enfermedades de la invención, a fin de monitorizar la eficacia de la terapia para enfermedades de la invención, o para el desarrollo de fármacos.

En cualquiera de los métodos anteriores, el nivel que puede detectarse en el sujeto candidato que presenta cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, es preferentemente 2 veces o más superior al nivel en el sujeto sano.

En una realización de la invención, la muestra de tejido de un sujeto (p.ej., un sujeto que se sospecha que presenta las enfermedades de la invención) se analiza mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas para la detección de DLL3. Una abundancia incrementada de DLL3 en el tejido del sujeto respecto a tejido de un sujeto o sujetos libres de las enfermedades de la invención (p.ej., una muestra de control) o un intervalo de referencia previamente determinado indica la presencia de las enfermedades de la invención.

En relación a los fragmentos, fragmentos que contienen epítomos, fragmentos inmunogénicos o fragmentos antigénicos de DLL3:

para las aplicaciones de cáncer relevantes, en un aspecto estos comprenden la secuencia identificada como una secuencia tríptica en el Ejemplo 1.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "se aísla" DLL3 al encontrarse presente en una preparación que se encuentra sustancialmente libre de proteínas contaminantes, es decir, una preparación en la que menos de 10% (por ejemplo, menos de 5%, tal como menos de 1%) de la proteína total presente es una o más proteínas contaminantes. Una proteína contaminante es una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos significativamente diferente de la de DLL3 aislado, según se determina mediante análisis espectral de masas. Tal como se utiliza en la presente memoria, una secuencia "significativamente diferente" es una que permite resolver la proteína contaminante respecto de DLL3 mediante análisis espectral de masas, realizado según el protocolo descrito en la presente memoria en el Ejemplo 1.

DLL3 puede someterse a ensayo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitarse al mismo, las Tecnologías preferidas descritas en la presente memoria, ensayos de quinasas, ensayos enzimáticos, ensayos de unión y otros ensayos funcionales, inmunoensayos y transferencia western.

Alternativamente, puede detectarse DLL3 en un inmunoensayo. En una realización, se lleva a cabo un inmunoensayo poniendo en contacto una muestra de un sujeto que debe someterse a ensayo con un anticuerpo anti-DLL3 (u otro reactivo de afinidad) bajo condiciones tales en que la unión (p.ej., la unión inmuno-específica) puede producirse en el caso de que DLL3 se encuentre presente, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión (p.ej., unión inmuno-específica) al agente. Los agentes de unión a DLL3 pueden producirse mediante los métodos y técnica que se enseñan en la presente memoria. En una realización particular, se analiza DLL3 utilizando inmunohistoquímica.

DLL3 puede detectarse en virtud de la detección de un fragmento del mismo, p.ej., un epítipo que contiene un fragmento (p.ej., inmunogénico o antigénico) del mismo. Los fragmentos pueden presentar una longitud de por lo menos 10, más típicamente de por lo menos 20 aminoácidos, p.ej., de por lo menos 50 o 100 aminoácidos, p.ej., de por lo menos 150 o 200 aminoácidos; p.ej., de por lo menos 300 o 500 aminoácidos; p.ej., de por lo menos 700 o 900 aminoácidos.

En una realización, la unión de un reactivo de afinidad (p.ej., un anticuerpo) en secciones de tejido puede utilizarse para detectar la localización de DLL3 aberrante o un nivel aberrante de DLL3. En una realización específica, un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) de DLL3 puede utilizarse para someter a ensayo un tejido del paciente (p.ej., un tejido de pulmón, páncreas y piel) para el nivel de DLL3 en el que un nivel aberrante de DLL3 es indicativo de las enfermedades de la invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "nivel aberrante" se refiere a un nivel que se encuentra incrementado en comparación con el nivel en un sujeto libre de las enfermedades de la invención o un nivel de referencia.

Puede utilizarse cualquier inmunoensayo adecuado, incluyendo, aunque sin limitación, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo utilizando técnicas, tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

Por ejemplo, puede detectarse DLL3 en una muestra de líquido (p.ej., sangre, orina o saliva) mediante un ensayo de tipo sándwich de dos etapas. En la primera etapa, se utiliza un reactivo de captura (p.ej., un anticuerpo anti-DLL3 u otro reactivo de afinidad) para capturar DLL3. El reactivo de captura opcionalmente puede inmovilizarse en una fase sólida. En la segunda etapa, se utiliza reactivo de detección marcado directa o indirectamente para detectar el DLL3 capturado. En una realización, el reactivo de detección es una lectina. Puede utilizarse cualquier lectina con este fin que se una preferentemente a DLL3 y no a otras isoformas que presentan la misma proteína nuclear que DLL3 o a otras proteínas que comparten el determinante antigénico reconocidas por el anticuerpo. En una realización preferente, la lectina seleccionada se une a DLL3 con una afinidad por lo menos 2 veces superior, más preferentemente una afinidad por lo menos 5 veces superior, todavía más preferentemente una afinidad por lo menos 10 veces superior, que dichas otras isoformas que presentan la misma proteína nuclear que DLL3 o que dichas otras proteínas que comparten el determinante antigénico reconocido por el reactivo de afinidad. Basándose en la presente descripción, una lectina que resulte adecuada para detectar DLL3 puede identificarse fácilmente mediante métodos bien conocidos de la técnica, por ejemplo tras el ensayo de una o más lectinas señaladas en la Tabla I, en las páginas 158-159 de Sumar et al., *Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms*, en: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, *Lectins and Glycobiology*, en las páginas 158 a 174. En una realización alternativa, el reactivo de detección es un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad), p.ej. un anticuerpo que detecta específicamente (p.ej., inmuno-específicamente) otras modificaciones post-traduccionales, tales como un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a aminoácidos fosforilados. Entre los ejemplos de dichos anticuerpos se incluyen los que se unen a fosfotirosina (BD Transduction Laboratories, n° de catálogo: P11230-050/P11230-150; P11120; P38820; P39020); los que se unen a fosfoserina (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, n° de catálogo 61-8100) y los que se unen a fosfotreonina (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, n° de catálogo 71-8200, 13-9200).

Si se desea, un gen codificante de DLL3, un gen relacionado, o secuencias o subsecuencias de ácido nucleico relacionadas, incluyendo secuencias complementarias, también pueden utilizarse en ensayos de hibridación. Un nucleótido codificante de DLL3, o subsecuencias del mismo que comprende por lo menos 8 nucleótidos, preferentemente por lo menos 12 nucleótidos, y más preferentemente por lo menos 15 nucleótidos, puede utilizarse a modo de una sonda de hibridación. Los ensayos de hibridación pueden utilizarse para la detección, pronóstico, diagnóstico o monitorización de condiciones, trastornos o estados de enfermedad, asociados a la expresión aberrante del gen codificante de DLL3, o para el diagnóstico diferencial de sujetos con signos o síntomas que sugieren, p.ej., las enfermedades de la invención. En particular, dicho ensayo de hibridación puede llevarse a cabo mediante un método que comprende poner en contacto una muestra del sujeto que contiene una sonda de ácidos nucleicos capaz de hibridarse con un ADN o ARN que codifica DLL3, bajo condiciones en las que puede producirse la hibridación, y detectar o medir cualquier hibridación resultante.

Por lo tanto, puede detectar un ácido nucleico codificante de DLL3 (p.ej., ADN o, más convenientemente, ARN), por ejemplo utilizando un agente de hibridación (particularmente una sonda oligonucleótida) capaz de hibridarse con ácido nucleico codificante de DLL3.

Un método ejemplar de dichos métodos comprende:

poner en contacto una o más sondas oligonucleótidas que comprenden 10 o más nucleótidos consecutivos complementarios a una secuencia de nucleótidos codificante de DLL3, con un ARN obtenido de una muestra biológica procedente del sujeto o con ADNc copiado del ARN, en el que dicha puesta en contacto se produce bajo condiciones que permiten la hibridación de la sonda con la secuencia de nucleótidos en caso de estar presente, detectar la hibridación, en caso de haber, entre la sonda y la secuencia de nucleótidos, y Comparar la hibridación, en caso de haber, detectada en la etapa (b) con la hibridación detectada en una muestra de control, o con un intervalo de referencia previamente determinado.

En la presente memoria se describen además kits diagnósticos, que comprenden un anticuerpo anti-DLL3 (u otro reactivo de afinidad). Además, dicho kit puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes:

- (1) instrucciones de utilización del reactivo de afinidad anti-DLL3 para el diagnóstico, pronóstico, monitorización terapéutica o cualquier combinación de dichas aplicaciones,
- (2) una pareja de unión marcada del reactivo de afinidad,
- (3) una fase sólida (tal como una tira reactiva) en la que se inmoviliza el reactivo de afinidad anti-DLL3, y
- (4) una etiqueta o inserción que indica la autorización administrativa para la utilización diagnóstica, pronóstica o terapéutica o cualquier combinación de las mismas. En el caso de que no se proporcione ninguna pareja de unión marcada del reactivo de afinidad, reactivo de afinidad anti-DLL3 mismo puede marcarse con un marcador detectable, p.ej., una fracción quimioluminiscente, enzimática, fluorescente o radioactiva.

En la presente memoria se describe además un kit que comprende una sonda de ácidos nucleicos capaz de hibridarse con el ácido nucleico, convenientemente ARN, codificante de DLL3. En una realización específica, un kit comprende uno o más recipientes con una pareja de cebadores (p.ej., cada una en el intervalo de tamaños de 6 a 30 nucleótidos, más preferentemente de 10 a 30 nucleótidos, y todavía más preferentemente de 10 a 20 nucleótidos) que bajo condiciones de reacción apropiadas puede cebar la amplificación de por lo menos una parte de un ácido nucleico codificante de DLL3, tal como mediante reacción en cadena de la polimerasa (ver, p.ej., Innis et al., PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990), reacción en cadena de la ligera (ver la patente nº EP 320.308), la utilización de Q β replicasa, la reacción de sonda cíclica, u otros métodos conocidos de la técnica.

Un kit opcionalmente puede contener además una cantidad predeterminada de DLL3 o un ácido nucleico codificante de DLL3, p.ej., para la utilización como un estándar o control.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" incluye un líquido corporal (p.ej., sangre, orina o saliva) y biopsias de tejido obtenidas de un sujeto en riesgo de presentar una o más de las enfermedades de la invención (p.ej., una biopsia, tal como una biopsia de pulmón, páncreas y piel) u homogenado de las mismas.

Por ejemplo, la muestra biológica utilizada puede proceder de cualquier fuente, tal como una muestra de suero o una muestra de tejido, p.ej., tejido de pulmón, páncreas y piel. Por ejemplo, al buscar evidencia de metástasis de las enfermedades de la invención, se observarían los sitios principales de metástasis de las enfermedades de la invención, p.ej., el cerebro, hígado, huesos y glándulas adrenales para cáncer de pulmón; el hígado, para el cáncer pancreático, o los pulmones, cerebro y huesos, para el cáncer de piel.

Alternativamente, la presencia de DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia de ácido nucleico codificante de DLL3 o la presencia de la actividad de DLL3, puede detectarse mediante análisis *in situ*.

En determinadas realizaciones, los métodos de diagnósticos indicados en la presente memoria pueden llevarse a cabo por lo menos parcialmente, o totalmente, *in vitro* o *ex vivo*.

Convenientemente, la presencia de DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia de ácido nucleico codificante de DLL3, o la presencia de la actividad de DLL3, se detecta cuantitativamente.

Por ejemplo, detectar cuantitativamente puede comprender:

poner en contacto una muestra biológica con un reactivo de afinidad que es específico para DLL3, conjugando opcionalmente dicho reactivo de afinidad con un marcaje detectable, y Detectar si la unión se ha producido entre el reactivo de afinidad y por lo menos una especie en la muestra, llevando a cabo dicha detección directa o indirectamente.

Alternativamente, la presencia de DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia de ácido nucleico

codificante de DLL3 o la presencia de la actividad de DLL3, puede detectarse cuantitativamente mediante la utilización de una tecnología de obtención de imágenes.

En otra realización, el método de la invención implica la utilización de inmunohistoquímica en, p.ej., secciones de tejido de pulmón, páncreas y piel a fin de determinar la presencia de DLL3, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia de ácido nucleico codificante de DLL3, o la presencia de la actividad de DLL3, para detectar de esta manera, p.ej., las células de las enfermedades de la invención.

En una realización, la presencia de DLL3 o uno o más fragmentos que contienen epítipo del mismo se detecta, por ejemplo, utilizando un reactivo de afinidad capaz de unión específica a DLL3 o uno o más fragmentos del mismo, tal como un anticuerpo.

En otra realización, se detecta la actividad de DLL3.

Utilización en estudios clínicos

Los métodos y composiciones diagnósticos indicados en la presente memoria pueden asistir en la monitorización de un estudio clínico, p.ej. para evaluar fármacos para la terapia de las enfermedades de la invención. En una realización, las moléculas candidatas se someten a ensayo para su capacidad de restaurar los niveles de DLL3 en un sujeto que presenta, p.ej., las enfermedades de la invención a niveles observados en sujetos que se encuentran libres de las enfermedades de la invención o, en un sujeto tratado, para conservar los niveles de DLL3 en valores iguales o próximos a los de ausencia de cáncer de pulmón, de ausencia de cáncer pancreático o de ausencia de cáncer de piel.

En otra realización, los métodos y composiciones de la presente invención se utilizan para cribar para candidatos para un estudio clínico a fin de identificar individuos que presentan, p.ej., las enfermedades de la invención; dichos individuos a continuación pueden excluirse del estudio o pueden añadirse a una cohorte separada para el tratamiento o el análisis.

Producción de proteína de la invención y ácido nucleico correspondiente

En un aspecto, en la presente memoria se describe un método de tratamiento o prevención de, p.ej., las enfermedades de la invención, que comprende administrar en un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nucleico codificante de DLL3 o uno o más fragmentos o derivados del mismo, por ejemplo en la forma de una vacuna.

En otro aspecto se proporciona un método de tratamiento o prevención de, p.ej., las enfermedades de la invención, que comprende administrar en un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nucleico inhibe la función o expresión de DLL3.

Los métodos (y/o otros aspectos de ADN dados a conocer en la presente memoria) pueden incluir, por ejemplo, que el ácido nucleico es un ácido nucleico antisentido de DLL3 o ribozima.

De esta manera, en la presente memoria se describe la utilización de ácido nucleico codificante de DLL3, o uno o más fragmentos o derivados del mismo, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de, p.ej., las enfermedades de la invención.

Se proporciona además la utilización de ácido nucleico que inhibe la función o expresión de DLL3 en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de, p.ej., una o más de las enfermedades de la invención.

Puede obtenerse un ADN utilizado en la presente invención mediante aislamiento en forma de un fragmento de ADNc a partir de bibliotecas de ADNc utilizando como materiales de partida, ARNm comerciales, y determinación e identificación de las secuencias de nucleótidos del mismo. Es decir, específicamente, se aíslan aleatoriamente clones a partir de bibliotecas de ADNc, que se preparan según el método de Ohara et al. (DNA Research Vol.4, 53-59, 1997). A continuación, mediante hibridación, se extraen clones duplicados (que aparecen repetidamente) y después se lleva a cabo una transcripción y una traducción *in vitro*. Se determinan las secuencias de los nucleótidos de ambos extremos de los clones para los cuales se confirman productos de 50 kDa o más.

Además, se realizan búsquedas en bases de datos de genes conocidos para homología utilizando las secuencias de nucleótidos terminales obtenidas de esta manera a modo de preguntas.

Además del método de cribado anteriormente indicado, las secuencias 5'- y 3'-terminales de ADNc están relacionadas con una secuencia genómica humana. A continuación, se confirma un gen de cadena larga desconocida en una zona entre las secuencias y se analiza la longitud completa del ADNc. De esta manera, un gen desconocido que no puede obtenerse mediante un método de clonación convencional que depende de genes conocidos puede clonarse sistemáticamente.

Además, también puede prepararse la totalidad de las regiones de un gen de origen humano que contiene un ADN de la presente invención, utilizando un método de PCR, tal como RACE, aunque prestando suficiente atención a que tengan lugar errores artificiales en fragmentos cortos o en las secuencias obtenidas. Tal como se ha indicado anteriormente, pueden obtenerse clones con ADN de la presente invención.

En otros medios de clonación del ADN de la presente invención, se produce un cebador de ADN sintético con una secuencia de nucleótidos apropiada de una parte de un polipéptido de la presente invención, seguido de la amplificación mediante el método de PCR utilizando una biblioteca apropiada. Alternativamente, puede llevarse a cabo la selección mediante hibridación del ADN de la presente invención con un ADN que se ha incorporado en un vector apropiado y se ha marcado con un fragmento de ADN o un ADN sintético codificante de algunas o todas las regiones del polipéptido de la presente invención. La hibridación puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el método descrito en *Current Protocols in Molecular Biology* (editado por Frederick M. Ausubel et al., 1987). El ADN de la presente invención puede ser cualquier ADN, con la condición de que contenga secuencias de nucleótidos codificantes de los polipéptidos de la presente invención tal como se ha indicado anteriormente. Dicho ADN puede ser un ADNc identificado y aislado a partir de bibliotecas de ADNc o similares que se derivan de tejido pulmonar, de páncreas y de piel. Dicho ADN también puede ser ADN sintético o similar. Los vectores para la utilización en la construcción de bibliotecas pueden ser cualquiera de bacteriófagos, plásmidos, cósmidos, fagémidos o similares. Además, mediante la utilización de una fracción de ARN total o una fracción de ARNm preparada a partir de las células y/o tejidos anteriores, la amplificación puede llevarse a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa acoplada con una transcripción inversa directa (en lo sucesivo en lo sucesivo en la presente memoria abreviado como "método de RT-PCR").

El ADN codificante del polipéptido anteriormente indicado que consiste en una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de DLL3 o el ADN codificante del polipéptido anterior que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de DLL3 mediante delección, sustitución o adición de uno o más aminoácidos que compone una parte de la secuencia de aminoácidos puede producirse fácilmente mediante una combinación apropiada de, por ejemplo, un método de mutagénesis dirigida a sitio, un método de recombinación génica homóloga, un método de elongación de cebador y el método de PCR conocido por el experto en la materia. Además, actualmente, un posible método para causar que un polipéptido presente una actividad biológica sustancialmente equivalente es la sustitución de aminoácidos homólogos (p.ej., aminoácidos polares y no polares, aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, aminoácidos con carga positiva y con carga negativa, y aminoácidos aromáticos) de entre los aminoácidos que componen el polipéptido. Además, para mantener una actividad biológica sustancialmente equivalente, los aminoácidos dentro de dominios funcionales contenidos en el polipéptido de la presente invención preferentemente se encuentran conservados.

Además, entre los ejemplos de ADN de la presente invención se incluye ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de DLL3 y ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas al ADN y codificante de un polipéptido (proteína) con actividad (función) biológica equivalente a la función del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de DLL3. Bajo dichas condiciones, un ejemplo de dicho ADN capaz de hibridarse con ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de DLL3 es ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una homología media global respecto a la secuencia de nucleótidos entera del ADN, tal como de aproximadamente 80% o superior, preferentemente de aproximadamente 90% o superior, y más preferentemente de aproximadamente 95% o superior. La hibridación puede llevarse a cabo según un método conocido de la técnica, tal como un método descrito en *Current Protocols in Molecular Biology* (editado por Frederick M. Ausubel et al., 1987) o un método según el mismo. En la presente memoria, "condiciones restrictivas" son, por ejemplo, condiciones de aproximadamente "1 SSC, SDS al 0,1% y 37°C", condiciones más restrictivas de aproximadamente de "0,5xSSC, SDS al 0,1% y 42°C", o condiciones todavía más restrictivas de aproximadamente "0,2xSSC, SDS al 0,1% y 65°C". Con condiciones de hibridación más restrictivas, puede esperarse el aislamiento de un ADN con una homología elevada respecto a una secuencia de sonda. Las combinaciones anteriormente indicadas de SSC, SDS y condiciones de temperaturas se proporcionan con fines ilustrativos. El experto en la materia podrá alcanzar una astringencia similar a la anteriormente indicada utilizando una combinación apropiada de los factores anteriormente indicados u otros factores (por ejemplo, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda y el tiempo de reacción para la hibridación) para la determinación de la astringencia de hibridación.

Un ADN clonado de la presente invención puede utilizarse directamente o utilizarse, si se desea, después de la digestión con un enzima de restricción o la adición de un conector, según el propósito. El ADN puede presentar ATG como codón de inicio en el lado 5'-terminal y presentar TAA, TGA o TAG como codón de terminación de la traducción en el lado 3'-terminal. Dichos codones de inicio de traducción y de terminación de traducción también pueden añadirse utilizando un adaptador de ADN sintético apropiado.

En los métodos/ usos de la invención, puede proporcionarse, por ejemplo, DLL3 en forma aislada, tal como en donde el polipéptido DLL3 se ha purificado por lo menos en cierto grado. El polipéptido DLL3 puede proporcionarse en forma sustancialmente pura, es decir, libre, en un grado sustancial, de otras proteínas. El polipéptido DLL3 también puede producirse utilizando métodos recombinantes, producirse sintéticamente o producirse mediante una combinación de

dichos métodos. DLL3 puede prepararse fácilmente mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, que implica producir un vector de expresión que contiene ADN apropiado de la presente invención o un gen que contiene un ADN de la presente invención, cultivar un transformante transformado utilizando el vector de expresión, generar y acumular un polipéptido relevante de la presente invención o una proteína recombinante que contiene el polipéptido, y después recoger lo resultante.

El polipéptido DLL3 recombinante puede prepararse mediante procedimientos bien conocidos de la técnica a partir de células huéspedes manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. De acuerdo con lo anterior, en la presente memoria se describen además sistemas de expresión que comprenden un polipéptido o ácido nucleico de DLL3, hasta células huésped que se manipulan genéticamente con dichos sistemas de expresión y la producción de polipéptido DLL3 mediante técnicas recombinantes. Para la producción de polipéptido DLL3 recombinante, las células huésped pueden manipularse genéticamente para incorporar sistemas de expresión o partes de los mismos para ácidos nucleicos. Dicha incorporación puede llevarse a cabo utilizando métodos bien conocidos de la técnica, tales como, la transfección con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga de raspaduras, introducción balística o infección (ver, p.ej., Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, 1986 y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989).

Como células huésped, se utilizan, por ejemplo, bacterias de los géneros *Escherichia*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *Streptomyces*, bacterias del género *Bacillus*, levadura, células de *Aspergillus*, células de insecto, insectos y células animales. Entre los ejemplos específicos de bacterias del género *Escherichia*, que se utilizan en la presente memoria, se incluyen *Escherichia coli* K12 y DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 60, 160, 1968), JM103 (Nucleic Acids Research, Vol. 9, 309, 1981), JA221 (Journal of Molecular Biology, vol. 120, 517, 1978) y HB101 (Journal of Molecular Biology, Vol. 41, 459, 1969). Como bacteria del género *Bacillus*, se utiliza, por ejemplo, *Bacillus subtilis* MI114 (Gene, vol. 24, 255, 1983) y 207-21 (Journal of Biochemistry, vol. 95, 87, 1984). Como levadura, se utiliza, por ejemplo, *Saccaromyces cerevisiae* AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, y 20B-12, *Schizosaccaromyces pombe* NCYC1913 y NCYC2036, y *Pichia pastoris*. Como células de insecto, se utilizan, por ejemplo, células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9. Como células animales, se utilizan, por ejemplo, células COS-7 y células Vero de mono, células de hámster chino CHO (en lo sucesivo en la presente memoria abreviadas como células CHO), células CHO deficientes en gen dhfr, células L de ratón, células AtT-20 de ratón, células de mieloma de ratón, células GH3 de rata, células FL humanas, células COS, HeLa, C127,3T3, HEK 293, BHK y células de melanoma de Bowes.

También pueden utilizarse sistemas de traducción sin células para producir polipéptidos recombinantes (p.ej., lisado de reticulocitos de conejo, lisado de germen de trigo, kits de transcripción y traducción SP6/T7 *in vitro* T&T y RTS 100 *E. coli* HY, de Roche Diagnostics Ltd., Lewes, Reino Unido, y el sistema TNT Quick de transcripción/traducción acoplada de Promega UK, Southampton, Reino Unido).

El vector de expresión puede producirse según un método conocido de la técnica. Por ejemplo, el vector puede producirse mediante (1) excisión de un fragmento de ADN que contiene un ADN de la presente invención o un gen que contiene un ADN de la presente invención, y (2) ligar el fragmento de ADN cadena abajo del promotor en un vector de expresión apropiado. Puede utilizarse una amplia diversidad de sistemas de expresión, tal como, aunque sin limitación, sistemas cromosómicos, episómicos y derivados de virus, p.ej., plásmidos derivados de *Escherichia coli* (p.ej., pBR322, pBR325, pUC18 y pUC118), plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (p.ej., pUB110, pTP5 y pC194), de bacteriófago, de trasposones, de episomas de levadura (p.ej., pS19 y pSH15), de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus, tales como baculovirus, virus papova, tales como SV40, virus Vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos plásmido y bacteriófago (tales como el fago [lambda]), tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan, así como engendran, expresión. Los promotores que deben utilizarse en la presente invención pueden ser cualesquiera promotores, con la condición de que resulten apropiados como huéspedes para la utilización en la expresión génica. Por ejemplo, en el caso de que el huésped sea *Escherichia coli*, resulta preferente un promotor trp, un promotor lac, un promotor recA, un promotor pL, un promotor lpp y similares. En el caso de que el huésped sea *Bacillus subtilis*, resultan preferentes un promotor SPO1, un promotor SPO2, un promotor penP y similares. En el caso de que el huésped sea una levadura, resultan preferentes un promotor PHO5, un promotor PGK, un promotor GAP, un promotor ADH y similares. En el caso de que se utilice una célula animal como huésped, entre los ejemplos de promotores para la utilización en este caso se incluyen un promotor Sra, un promotor SV40, un promotor LTR, un promotor CMV y un promotor HSV-TK. Generalmente, puede utilizarse cualquier sistema o vector que sea capaz de mantener, propagar o expresar un ácido nucleico para producir un polipéptido en un huésped.

La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en un sistema de expresión mediante cualquiera de entre la diversidad de técnicas bien conocidas y rutinarias, tales como las indicadas en Sambrook et al., *supra*. Pueden introducirse señales de secreción apropiadas en el polipéptido DLL3 para permitir la secreción de la proteína traducida a la luz del retículo endoplásmico, el espacio periplásmico o el medio extracelular. Dichas señales pueden ser endógenas al polipéptido DLL3 o pueden ser señales heterólogas. La transformación de las células huésped puede llevarse a cabo según métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, puede hacerse referencia a los documentos

siguientes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 69, 2110, 1972; Gene, vol. 17, 107, 1982; Molecular & General Genetics, vol. 168, 111, 1979; Methods in Enzymology, vol. 194, 182-187, 1991; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 75, 1929, 1978; Cell Technology, volumen separado nº 8, New Cell Technology, Experimental Protocol 263-267, 1995 (publicación de Shujunsha) y Virology, vol. 52, 456, 1973. El transformante obtenido de esta manera, transformado con un vector de expresión que contiene un ADN de la presente invención o un gen que contiene un ADN de la presente invención, puede cultivarse según un método conocido de la técnica. Por ejemplo, en el caso de que los huéspedes sean bacterias del género *Escherichia*, las bacterias se cultivan generalmente a una temperatura de aproximadamente 15°C a 43°C durante aproximadamente 3 a 24 h. En caso necesario, también puede añadirse aireación o agitación. En el caso de que los huéspedes sean bacterias del género *Bacillus*, las bacterias se cultivan generalmente a aproximadamente 30°C a 40°C, durante aproximadamente 6 a 24 horas. En caso necesario, también puede añadirse aireación o agitación. En el caso de que se cultiven transformantes cuyos huéspedes sean levaduras, el cultivo se lleva a cabo generalmente a aproximadamente 20°C a 35°C durante aproximadamente 24 a 72 h utilizando medios con pH ajustado a un valor entre aproximadamente 5 y 8. En caso necesario, también puede añadirse aireación o agitación. En el caso de que se cultiven transformantes cuyos huéspedes sean células animales, las células generalmente se transforman a aproximadamente 30°C a 40°C durante aproximadamente 15 a 60 h utilizando medio con el pH ajustado a un valor entre aproximadamente 6 y 8. En caso necesario, también puede añadirse aireación o agitación.

En el caso de que deba expresarse un polipéptido DLL3 para la utilización en ensayos de cribado basado en células, resulta preferente que el polipéptido se produzca en la superficie celular. En este caso, las células pueden recolectarse antes de la utilización en el ensayo de cribado. En el caso de que el polipéptido DLL3 se secrete al medio, el medio puede recuperarse a fin de aislar dicho polipéptido. En el caso de que se produzca intracelularmente, las células en primer lugar deben lisarse antes de recuperar el polipéptido DLL3.

El polipéptido DLL3 puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes o a partir de otras fuentes biológicas mediante métodos bien conocidos, incluyendo precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en hidroxilapatito, cromatografía de tamizado molecular, métodos de centrifugación, métodos de electroforesis y cromatografía de lectina. En una realización, se utiliza una combinación de dichos métodos. En otra realización, se utiliza cromatografía líquida de alto rendimiento. En una realización adicional, puede utilizarse un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido DLL3 para agotar en una muestra que comprende un polipéptido DLL3 dicho polipéptido o para purificar dicho polipéptido.

A fin de separar y purificar un polipéptido o una proteína de la presente invención a partir de productos de cultivo, por ejemplo, después del cultivo, se recogen cuerpos o células microbianos mediante un método conocido; se suspenden en un tampón apropiado; los cuerpos o las células microbianos se rompen, por ejemplo mediante ondas ultrasónicas, lisozimas y/o congelación-descongelación; lo resultante a continuación se somete a centrifugación o filtración y después puede obtenerse un extracto en bruto de la proteína. El tampón puede contener además un agente de desnaturalización de proteínas, tal como urea o hidrocloreuro de guanidina o un surfactante, tal como Triton X-100(TM). En el caso de que la proteína se secrete en una solución de cultivo, los cuerpos o células microbianos y un sobrenadante se separan mediante un método conocido después de completar el cultivo y después se recoge el sobrenadante. La proteína contenida en el sobrenadante de cultivo obtenido de esta manera o el extracto puede purificarse mediante una combinación apropiada de métodos conocidos de separación y purificación. El polipéptido (proteína) de la presente invención obtenido de esta manera puede convertirse en una sal mediante un método conocido o un método según la misma. A la inversa, en el caso de que el polipéptido (proteína) de la presente invención se obtenga en forma de una sal, puede convertirse en una proteína o péptido libre u otra sal mediante un método conocido o un método según la misma. Además, se causa que un enzima apropiado de modificación de la proteína, tal como tripsina o quimiotripsina, actúe sobre la proteína producida por un recombinante antes o después de la purificación, de manera que la modificación puede añadirse arbitrariamente o puede extraerse parcialmente un polipéptido. La presencia de un polipéptido (proteína) de la presente invención o una sal del mismo puede medirse mediante diversos ensayos de unión, inmunoensayos enzimáticos con anticuerpos específicos, y similares.

Pueden utilizarse técnicas bien conocidas para el repliegue a fin de regenerar las conformaciones nativas o activas del polipéptido DLL3 en el caso de que el polipéptido haya sido desnaturalizado durante el aislamiento y/o la purificación. En el contexto de la presente invención, el polipéptido DLL3 puede obtenerse a partir de una muestra biológica de cualquier origen, tal como, y sin limitación, una muestra de sangre o una muestra de tejido, p.ej., una muestra de tejido de pulmón, páncreas y piel.

El polipéptido DLL3 puede encontrarse en forma de una "proteína madura" o puede ser parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión. Con frecuencia resulta ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias secretorias o líder, una secuencia de pre-proteína, pro-proteína o prepro-proteína, o una secuencia que ayude en la purificación, tal como una etiqueta de afinidad, por ejemplo, aunque sin limitación, múltiples residuos de histidina, una etiqueta FLAG, una etiqueta HA o una etiqueta myc.

DLL3 puede, por ejemplo, fusionarse con una pareja de fusión heteróloga, tal como la proteína de superficie, conocida

como proteína D de *Haemophilus influenza* B, una proteína no estructural de virus influenza, tal como NS1, el antígeno S de la hepatitis B o una proteína conocida como LYTA, tal como el extremo C-terminal de la misma.

También puede utilizarse una secuencia adicional que pueda proporcionar estabilidad durante la producción recombinante. Dichas secuencias pueden eliminarse opcionalmente según se requiera mediante la incorporación de una secuencia escindible como secuencia adicional o parte de la misma. De esta manera, un polipéptido DL3 puede fusionarse con otras fracciones, incluyendo otros polipéptidos o proteínas (por ejemplo, glutatión-S-transferasa y proteína A). Dicha proteína de fusión puede cortarse utilizando una proteasa apropiada y después separarse en cada proteína. Dichas secuencias adicionales y etiquetas de afinidad son bien conocidas de la técnica. Además de lo anterior, pueden añadirse elementos conocidos de la técnica, tales como un intensificador, una señal de corte y empalme, una señal de adición de poliA, un marcador de selección y un origen de replicación de SV40, a un vector de expresión, si se desea.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un agente capaz de unión específica a DLL3 o un fragmento del mismo, o un agente de hibridación capaz de hibridación a un ácido nucleico codificante de DLL3 o un agente capaz de detectar la actividad de DLL3 para la utilización en el tratamiento, cribado, detección y/o diagnóstico de enfermedades, tales como el cáncer, y especialmente las enfermedades de la invención.

Producción de reactivos de afinidad para DLL3

En un aspecto, la invención se refiere a un reactivo de afinidad, en el que el reactivo de afinidad es un anticuerpo biespecífico tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, el reactivo de afinidad o inmunoafinidad es capaz de unión específica a DLL3 o un fragmento del mismo, por ejemplo un reactivo de afinidad que contiene o está conjugado con un marcaje detectable o contiene o está conjugado con una fracción terapéutica, tal como una fracción citotóxica. El agente de afinidad puede ser, por ejemplo, un anticuerpo. El reactivo de afinidad puede ser un reactivo de afinidad aislado o un reactivo de afinidad purificado. El reactivo de afinidad para la utilización en la invención puede unirse a un epítipo en DLL3, p.ej., una o más de las partes de cualquiera de SEC ID nº 1 o nº 2. Preferentemente, el reactivo de afinidad se une específicamente al dominio extracelular (p.ej., la cola extracelular o bucle extracelular) de DLL3 (p.ej., a la SEC ID nº 12).

Según el experto en la materia, existen tres tipos principales de reactivo de inmunoafinidad: anticuerpos monoclonales, anticuerpos de expresión fágica y moléculas derivadas de anticuerpos más pequeñas, tales como aficuerpos, anticuerpos de dominio (dAb), Nanobodies®, unicuerpos, DARPin, anticalinas, duocalinas, avimeros o versacuerpos. En general, en aplicaciones según la presente invención en las que se indica la utilización de anticuerpos, pueden utilizarse otros reactivos de afinidad (p.ej., aficuerpos, anticuerpos de dominio, Nanocuerpos®, unicuerpos, DARPin, anticalinas, duocalinas, avimeros o versacuerpos). Puede afirmarse que dichas sustancias son capaces de unión inmuno-específica a DLL3. En caso apropiado, la expresión "agente de afinidad" debe interpretarse que comprende reactivos de inmunoafinidad y otras sustancias capaces de unión específica a DLL3, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, ligandos, lectinas, estreptavidinas, miméticos de anticuerpo y agentes de unión sintéticos.

Producción de anticuerpos de DLL3

Según la invención, DLL3, un análogo de DLL3, una proteína relacionada con DLL3 o un fragmento o derivado de cualquiera de los anteriores puede utilizarse como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen inmuno-específicamente, tal como un inmunógeno. Dichos inmunógenos pueden aislarse mediante cualesquiera medios convencionales, incluyendo los métodos indicados anteriormente. El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un péptido o polipéptido derivado de, modelado a partir de o sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, capaces de unión específica a un antígeno o epítipo. Ver, p.ej., Fundamental Immunology, 3a edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y., 1993; Wilson, J. Immunol. Methods 175:267-273, 1992; Yarmush, J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97, 1992. El término anticuerpo incluye partes de unión a antígeno, es decir, "sitio de unión a antígeno" (p.ej., fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés)) que conservan la capacidad de unirse a antígenos, incluyendo: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio VH, y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos de cadena sencilla también se encuentran incluidos en la referencia al término "anticuerpo". Entre los anticuerpos de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (p.ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA, tal como IgG) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

La expresión "se une específicamente" o "específicamente se une" (o "se une inmuno-específicamente") no pretende

indicar que un anticuerpo se une exclusivamente a su diana deseada. Por el contrario, un anticuerpo “se une específicamente” en el caso de que su afinidad para su diana deseada típicamente sea aproximadamente 5 veces superior en comparación con su afinidad para una molécula no diana. Convenientemente, no existe ninguna reacción cruzada o unión cruzada significativa con sustancias no deseadas, especialmente proteínas o tejidos de origen natural de una persona o animal sano. Preferentemente, la afinidad del anticuerpo será de por lo menos aproximadamente 5 veces, preferentemente 10 veces, más preferentemente 25 veces, todavía más preferentemente 50 veces y lo más preferentemente 100 veces o más, superior para una molécula diana que su afinidad para una molécula no diana. En algunas realizaciones, la unión específica entre un anticuerpo u otro agente de unión y un antígeno se refiere a una afinidad de unión de por lo menos 10^6 M^{-1} . Los anticuerpos pueden unirse, por ejemplo, con afinidades de por lo menos aproximadamente 10^7 M^{-1} y preferentemente de entre aproximadamente 10^8 M^{-1} y aproximadamente 10^9 M^{-1} , de entre aproximadamente 10^9 M^{-1} y aproximadamente 10^{10} M^{-1} , o de entre aproximadamente 10^{10} M^{-1} y aproximadamente 10^{11} M^{-1} .

La afinidad se calcula como $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} es la constante de tasa de disociación, k_{on} es la constante de tasa de asociación y K_d es la constante de equilibrio. La afinidad puede determinarse en el equilibrio mediante la medición de la fracción unida (r) de ligando marcado a diversas concentraciones (c). Los datos se representan gráficamente utilizando la ecuación de Scatchard: $r/c = K(n-r)$; en donde:

r =moles de ligando unido/mol de receptor en el equilibrio;
 c =concentración de ligando libre en el equilibrio;
 K =constante de asociación en el equilibrio, y
 n =número de sitio de unión a ligando por cada molécula de receptor.

Mediante análisis gráfico, se representa gráficamente r/c en el eje Y frente a r en el eje X, produciendo de esta manera un gráfico de Scatchard. La afinidad es la pendiente negativa de la línea. Puede determinarse k_{off} ligando marcado en unión competitiva con ligando en exceso no marcado (ver, p.ej., patente nº US 6.316.409). La afinidad de un agente de localización para su molécula diana es, por ejemplo, de por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} moles/litro, tal como de por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} moles/litro, especialmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-9} moles/litro, y particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-10} moles/litro. La medición de la afinidad de anticuerpos mediante análisis de Scatchard es bien conocida de la técnica; ver, p.ej., van Erp et al., J. Immunoassay 12: 425-43, 1991; Nelson y Griswold, Comput. Methods Programs Biomed. 27: 65-8, 1988.

En una realización, pueden utilizarse cualesquiera anticuerpos disponibles públicamente que reconozcan productos génicos de genes que codifican DLL3. En otra realización, se utilizan métodos conocidos por el experto en la materia para producir anticuerpos que reconocen DLL3, un análogo de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3 o un fragmento o derivado de cualquiera de los anteriormente indicados. El experto en la materia reconocerá que se encuentran disponibles muchos procedimientos para la producción de anticuerpos, por ejemplo tal como se indica en Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988. El experto en la materia también apreciará que los fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan anticuerpos también pueden prepararse a partir de información genética mediante diversos procedimientos (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebæck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920, 1992).

En una realización de la invención, se producen anticuerpos de un dominio específico de DLL3. En una realización específica, se utilizan fragmentos hidrofílicos de DLL3 como inmunógenos para la producción de anticuerpos.

En la producción de anticuerpos, puede llevarse a cabo el cribado para el anticuerpo deseado mediante técnicas conocidas, p.ej., ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligada a enzima). Por ejemplo, para la selección de anticuerpos que reconocen un dominio específico de DLL3, pueden someterse a ensayo hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de DLL3 que contiene dicho dominio. Para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a un primer homólogo de DLL3 pero que no se une específicamente (o se une con menor avidéz) a un segundo homólogo de DLL3, puede realizarse la selección basándose en la unión positiva al primer homólogo de DLL3 y una falta de unión (o una unión reducida) al segundo homólogo de DLL3. De manera similar, para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a DLL3 pero que no se une específicamente (o se une con menor avidéz) a una isoforma diferente de la misma proteína (tal como una glucoforma diferente con el mismo péptido nuclear que DLL3), puede realizarse la selección basándose en la unión positiva a DLL3 y una falta de unión (o una unión reducida) a la isoforma diferente (p.ej., una glucoforma diferente). De esta manera, la presente invención proporciona un anticuerpo (tal como un anticuerpo monoclonal) que se une con mayor afinidad (por ejemplo, por lo menos 2 veces, tal como por lo menos 5 veces, particularmente por lo menos 10 veces mayor afinidad) a DLL3 que a una isoforma o isoformas diferentes (p.ej., glucoformas) de DLL3.

Los anticuerpos policlonales que pueden utilizarse en los métodos de la invención son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados. También puede utilizarse suero inmune no fraccionado. Pueden utilizarse diversos procedimientos conocidos de la técnica para la producción de anticuerpos

policlonales de DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3 o un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3. Por ejemplo, un modo es purificar los polipéptidos de interés o sintetizar los polipéptidos de interés utilizando, p.ej., métodos de síntesis peptídica en fase sólida bien conocidos de la técnica. Ver, p.ej., Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol. vol. 182, 1990; Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., Meth. Enzymol. vol. 289, 1997; Kiso et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1: 255-60, 1995; Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. A continuación, los polipéptidos seleccionados pueden utilizarse para inmunizar mediante inyección diversos animales huésped, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, conejos, ratones, ratas, etc., para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. En el caso de que se purifique DLL3 mediante electroforesis en gel, puede utilizarse DLL3 para la inmunización con o sin extracción previa a partir del gel de poliacrilamida. Pueden utilizarse diversos adyuvantes (es decir, inmunoestimulantes) para potenciar la respuesta inmunitaria, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, adyuvante de Freund completo o incompleto, un gel mineral tal como hidróxido de aluminio, sustancia activa en superficie, tal como lisolecitina, polioli plurónico, un polianión, un péptido, una emulsión aceite, hemocianina de lapa americana, dinitrofenol y un adyuvante, tal como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) o *Corynebacterium parvum*. Son bien conocidos de la técnica adyuvantes adicionales.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3 o un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, puede utilizarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, Nature 256:495-497, 1975), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., Immunology Today 4:72, 1983) y la técnica del EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., en: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77 a 96, 1985). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. El hibridoma que produce los mAb de la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. En una realización adicional de la invención, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes utilizando tecnología conocida (documento n° WO9013678A1).

Entre los anticuerpos monoclonales se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales quiméricos (p.ej., quimeras de ser humano-ratón). Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes se derivan de diferentes especies animales, tales como las que presentan una región constante de inmunoglobulina humana y una región variable derivada de un mAb murino (ver, p.ej., Cabilly et al., patente US n° 4.816.567 y Boss et al., patente US n° 4.816.397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos procedentes de una especie no humano que presentan una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (ver, p.ej., Queen, patente US n° 5.585.089).

Los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas, por ejemplo utilizando métodos descritos en la publicación de patente PCT n° WO 87/02671, solicitud de patente europea n° 184.187, solicitud de patente europea n° 171.496, solicitud de patente europea n° 173.494, publicación de patente PCT n° WO 86/01533, patente US n° 4.816.567, solicitud de patente europea n° 125.023; Better et al., Science 240:1041-1043, 1988; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443, 1987; Liu et al., J. Immunol. 139:3521-3526, 1987; Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218, 1987; Nishimura et al., Canc. Res. 47:999-1005, 1987; Wood et al., Nature 314:446-449, 1985 y Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559, 1988; Morrison, Science 229:1202-1207, 1985; Oi et al., BioTechniques 4:214, 1986; patente US n° 5.225.539; Jones et al., Nature 321:552-525, 1986; Verhoeven et al. Science 239:1534, 1988 y Beidler et al., J. Immunol. 141:4053-4060, 1988.

Los anticuerpos completamente humanos resultan particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Dichos anticuerpos pueden producirse utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógena, aunque pueden expresar genes de cadenas pesadas y ligeras humanas. Los ratones transgénicos se inmunizan del modo normal con un antígeno seleccionado, p.ej., la totalidad o una parte de DLL3. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse utilizando tecnología convencional del hibridoma. Los transgenes de inmunoglobulina humana contenidos en los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de las células B y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. De esta manera, utilizando dicha técnica, resulta posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una descripción general de dicha tecnología de producción de anticuerpos humanos, ver Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93, 1995). Para un comentario detallado de dicha tecnología de producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos de producción de dichos anticuerpos, ver, p.ej., las patentes US n° 5.625.126, n° 5.633.425, n° 5.569.825, n° 5.661.016 y n° 5.545.806. Además, puede entrarse en contacto con compañías tales como Abtenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a la indicada anteriormente.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse utilizando una técnica denominada "selección guiada". En dicho enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, p.ej.,

un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers et al., *BioTechnology* 12:899-903, 1994).

Los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse mediante la utilización de tecnología de expresión fágica para producir y cribar bibliotecas de polipéptidos para la unión a una diana seleccionada. Ver, p.ej., Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., *Science* 249, 404-6, 1990, Scott y Smith, *Science* 249, 386-88, 1990, y Ladner et al., patente US nº 5.571.698. Un concepto básico de los métodos de expresión fágica es el establecimiento de una asociación física entre ADN codificante de un polipéptido que debe cribarse y el polipéptido. Dicha asociación física es proporcionada por la partícula fágica, que expresa un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma fágico que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre los polipeptidos y su material genético permite el cribado en masa simultáneo de un gran número de fagos portadores de diferentes polipéptidos. Los fagos que expresan un polipéptido con afinidad para una diana se unen a la misma y se enriquece en estos fagos mediante cribado de afinidad para la diana. La identidad de los polipéptidos expresados a partir de estos fagos puede determinarse a partir de los genomas respectivos. Utilizando dichos métodos, un polipéptido en el que se identifica una afinidad de unión para una diana deseada puede sintetizarse a continuación en masa por medios convencionales. Ver, p.ej., la patente US nº 6.057.098, incluyendo todas las tablas, figuras y reivindicaciones. En particular, dicho fago puede utilizarse para expresar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatorial de anticuerpos (p.ej., humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, p.ej., utilizando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos utilizados en dichos métodos típicamente son fagos filamentosos, incluyendo los dominios de unión a fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado por disulfuro, fusionados recombinantemente con la proteína fágica del gen III o del gen VIII. Entre los métodos de expresión fágica que pueden utilizarse para producir los anticuerpos de la presente invención se incluyen los dados a conocer en Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50, 1995; Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24:952-958, 1994; Persic et al., *Gene* 187 9-18, 1997; Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280, 1994; publicaciones de patente PCT nº WO92/01047A1, nº WO 90/02809; nº WO 91/10737; nº WO 92/01047; nº WO 92/18619; nº WO 93/11236; nº WO 95/15982; WO 95/20401 y patentes US nº 5.698.426; nº 5.223.409; nº 5.403.484; nº 5.580.717; nº 5.427.908; nº 5.750.753; nº 5.821.047; nº 5.571.698; nº 5.427.908; nº 5.516.637; nº 5.780.225; nº 5.658.727; nº 5.733.743 y 5.969.108.

Tal como se indica en las referencias anteriores, tras la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpo del fago pueden aislarse y utilizarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, p.ej., tal como se indica en detalle posteriormente. Por ejemplo, también pueden utilizarse técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ utilizando métodos conocidos de la técnica, tales como los dados a conocer en la publicación de patente PCT nº WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869, 1992 y Sawai et al., *AJRI* 34:26-34, 1995, y Better et al., *Science* 240:1041-1043, 1988.

Entre los ejemplos de técnicas que pueden utilizarse para producir Fv de cadena sencilla y anticuerpos se incluyen los indicados en las patentes US nº 4.946.778 y nº 5.258.498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88, 1991; Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999, 1993 y Skerra et al., *Science* 240:1038-1040, 1988.

La invención proporciona además la utilización de anticuerpos biespecíficos, que pueden prepararse mediante métodos conocidos de la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas presentan diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature* 305:537-539, 1983). Debido a la combinación aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, dichos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que únicamente una presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se lleva a cabo mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante compleja y los rendimientos de producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento nº WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659, 1991.

Según un enfoque diferente y más preferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, y regiones de CH2 y CH3. Resulta preferente que la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera se encuentre presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN codificantes de las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Lo anterior proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en el caso de que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionen los rendimientos óptimos. Sin embargo, resulta posible insertar las secuencias codificantes de dos o de las tres cadenas polipeptídicas en un vector

de expresión en el caso de que la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales resulte en rendimientos elevados o en el caso de que las proporciones no resulten particularmente significativas.

En una realización preferente de dicho enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha encontrado que dicha estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado respecto de combinaciones no deseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo sencillo de separación. Dicho enfoque se da a conocer en el documento nº WO 94/04690, publicado el 3 de marzo de 1994. Para más información sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, ver, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210, 1986.

La invención proporciona fragmentos, derivados o análogos funcionalmente activos de las moléculas de inmunoglobulina anti-DLL3. La expresión funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de inducir anticuerpos anti-anti-idiotipo (es decir, anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que resulta reconocido por el anticuerpo a partir del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización preferente, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede potenciarse mediante delección del marco y secuencias de CDR que son C-terminales respecto a la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, pueden utilizarse péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido de la técnica.

La presente invención proporciona fragmentos de anticuerpo tales como, aunque sin limitación, fragmentos $F(ab')_2$ y fragmentos Fab. Pueden generarse mediante técnicas conocidas fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos. Los fragmentos $F(ab')_2$ consisten en región variable, región constante de cadena ligera y dominio CH1 de la cadena pesada y se generan mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab se generan mediante reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. La invención proporciona además dímeros de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos de la invención, o cualquier fragmento mínimo de los mismos, tales como Fv o anticuerpos de cadena sencilla (ACS) (p.ej., tal como se indica en la patente US nº 4.946.778; Bird, *Science* 242:423-42, 1988; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, y Ward et al., *Nature* 334:544-54, 1989), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo de la invención. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y cadena ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, resultando en un polipéptido de cadena sencilla. Pueden utilizarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., *Science* 242:1038-1041, 1988).

En otras realizaciones, la invención proporciona proteínas de fusión de las inmunoglobulinas de la invención (o fragmentos funcionalmente activos de las mismas), por ejemplo en las que la inmunoglobulina se fusiona mediante un enlace covalente (p.ej., un enlace peptídico), en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma, preferentemente una parte de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es la inmunoglobulina. Preferentemente, la inmunoglobulina, o fragmento de la misma, se une covalentemente a la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio constante. Tal como se ha indicado anteriormente, dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, incrementar la semivida *in vivo* y potenciar la administración de un antígeno a través de una barrera epitelial hasta el sistema inmunitario.

Entre las inmunoglobulinas de la invención se incluyen análogos y derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula, con la condición de que dicha unión covalente no perjudique a la unión inmuno-específica. Por ejemplo, aunque no a título limitativo, entre los derivados y análogos de las inmunoglobulinas se incluyen aquellos que han sido adicionalmente modificados, p.ej., mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, corte proteolítico, unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Pueden llevarse a cabo numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, aunque sin limitación, corte químico específico, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos anteriormente indicados pueden utilizarse en métodos conocidos relacionados con la localización y actividad de DLL3, p.ej., para la obtención de imágenes de dicha proteína, medición de los niveles de la misma en muestras fisiológicas apropiadas, en métodos diagnósticos, etc.

Producción de anticuerpos de DLL3

Las moléculas de aficuerpo representan una nueva clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de proteína de 58 residuos aminoácidos, derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Dicho dominio de haz de tres hélices se ha utilizado como andamiaje para la construcción de bibliotecas de fagémido combinatoriales, a partir de las que variantes de aficuerpo con diana en las moléculas deseadas pueden seleccionarse utilizando tecnología de expresión fágica (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, *Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain*, *Nat. Biotechnol.* 15:772-7,

1997). Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur. J. Biochem. 269:2647-55, 2002). La estructura robusta y simple de las moléculas de aficuerpo en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa), los convierte en adecuados para una amplia diversidad de aplicaciones, por ejemplo como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T. et al., Construction and characterization of Affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli, J. Immunol. Methods 261:199-211, 2002) y para inhibir las interacciones de receptores (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng. 16:691-7, 2003). Puede obtenerse más información sobre los aficuerpos y métodos de producción de los mismos mediante referencia a la patente US nº 5.831.012.

Los aficuerpos marcadores también pueden resultar útiles en aplicaciones de obtención de imágenes para determinar la abundancia de las isoformas.

Producción de anticuerpos de dominio contra DLL3

Las referencias a anticuerpos en la presente memoria comprenden las referencias a anticuerpos de dominio. Los anticuerpos de dominio (dAb) son las unidades de unión funcionales más pequeñas de los anticuerpos, correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio presentan un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas de gran tamaño y altamente funcionales de dAb de VH y VL totalmente humanos (más de diez mil millones de secuencias diferentes en cada biblioteca) y utiliza dichas bibliotecas para seleccionar dAb que son específicos para dianas terapéuticas. En contraste con muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio están bien expresados en los sistemas celulares de bacterias, levaduras y mamíferos. Puede obtenerse más información sobre los anticuerpos de dominio y métodos de producción de los mismos haciendo referencia a las patentes US nº 6.291.158, nº 6.582.915, nº 6.593.081, nº 6.172.197, nº 6.696.245; documento de patente US nº de serie 2004/0110941, solicitud de patente europea nº 1433846 y patentes europeas nº 0368684 y nº 0616640; documentos nº WO05/035572, nº WO04/101790, nº WO04/081026, nº WO04/058821, nº WO04/003019 y nº WO03/002609.

Producción de Nanobodies® contra DLL3

Los Nanobodies® son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos, que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada de origen natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un dominio variable único (VHH) y dos dominios constantes (C_H2 y C_H3). Cabe destacar que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que incluye la capacidad de unión a antígeno completa del anticuerpo de cadena pesada original. Los Nanobodies® presentan una homología elevada respecto a los dominios V_H de los anticuerpos humanos y pueden humanizarse adicionalmente sin ninguna pérdida de actividad. Cabe destacar que los Nanobodies® presentan un bajo potencial inmunogénico, lo que se ha confirmado en estudios en primates con compuestos de cabeza de serie de Nanobody®.

Los Nanobodies® combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con importantes características de los fármacos de molécula pequeña. Al igual que los anticuerpos convencionales, los Nanobodies® muestran una elevada especificidad de diana, elevada afinidad para su diana y baja toxicidad inherente. Sin embargo, al igual que los fármacos de molécula pequeña, pueden inhibir enzimas y acceder con facilidad a surcos de receptor. Además, los Nanobodies® son extremadamente estables, pueden administrarse mediante medios diferentes de la inyección (ver, p.ej., el documento nº WO 04/041867) y resultan fáciles de fabricar. Entre otras ventajas de los Nanobodies® se incluyen el reconocimiento de epítomos no comunes u ocultos como consecuencia de su pequeño tamaño, unión en cavidades o sitios activos de dianas proteínas con elevadas afinidad y selectividad debido a su flexibilidad tridimensional de formato del fármaco única, personalización de la semivida y facilidad y rapidez de identificación de fármacos.

Los Nanobodies® están codificados por genes únicos y se producen eficientemente en la práctica totalidad de los huéspedes procarióticos y eucarióticos, p.ej., *E. coli* (ver, p.ej., la patente US nº 6.765.087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (ver, p.ej., la patente US nº 6.838.254). El procedimiento de producción es escalable y se han producido cantidades de varios kilogramos de Nanobodies®. Debido a que los Nanobodies® muestran una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, pueden formularse en forma de una solución lista para utilizar de vida de almacenamiento prolongada.

El método Nanoclone (ver, p.ej., el documento nº WO 06/079372) es un método propietario para generar Nanobodies® contra una diana deseada, basado en la selección de alto rendimiento automatizada de células B.

Producción de UniBodies contra DLL3

Los UniBodies son otra tecnología de fragmentos de anticuerpos; sin embargo, ésta se basa en la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La delección de la región bisagra resulta en una molécula que es esencialmente

la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales y presenta una región de unión univalente en lugar de la región de unión bivalente de los anticuerpos IgG4. También es bien conocido que los anticuerpos IgG4 son inertes y, de esta manera, no interactúan con el sistema inmunitario, lo que puede resultar ventajoso para el tratamiento de enfermedades en los que no se desea una respuesta inmunitaria y esta ventaja se pasa a los UniBodies. Por ejemplo, los UniBodies pueden funcionar inhibiendo o silenciando, aunque no eliminando, las células a las que se unen. Adicionalmente, la unión de UniBody a las células de cáncer no estimula su proliferación. Además, debido a que los UniBodies presentan aproximadamente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden mostrar una mejor distribución en tumores sólidos de mayor tamaño, con una eficacia potencialmente ventajosa. Los UniBodies se eliminan del cuerpo a una tasa similar a los anticuerpos IgG4 completos y son capaces de unirse con una afinidad similar para sus antígenos que los anticuerpos completos. Puede obtenerse más información sobre los UniBodies haciendo referencia al documento de patente nº WO2007/059782.

Producción de DARPin contra DLL3

Los DARPin (proteínas de repetición de anquirina de diseño) son un ejemplo de una tecnología DRP (proteína de repetición de diseño) mimética de anticuerpo que se ha desarrollado para aprovechar las capacidades de unión de los polipéptidos no anticuerpos. Las proteínas de repetición, tales como las proteínas de repetición de anquirina o las ricas en leucinas, son moléculas de unión ubicuas, que se observan, al contrario que los anticuerpos, intracelular y extracelularmente. Su arquitectura modular única muestra unidades estructurales repetitivas (repeticiones), que se apilan formando dominios de repetición alargados que muestran superficies de unión a la diana variables y modulares. Basándose en dicha modularidad, pueden generarse bibliotecas combinatoriales de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño de consenso de repeticiones autocompatibles que muestran residuos de superficie variables y su ensamblaje aleatorio en dominios de repetición.

Los DARPin pueden producirse en sistemas de expresión bacteriana a rendimientos muy elevados y son de las proteínas más estables conocidas. Se seleccionaron DARPin de alta afinidad altamente específicos contra un amplio abanico de proteínas diana, incluyendo receptores humanos, citoquinas, quinasas, proteasas humanas, virus y proteínas membranales. Pueden obtenerse DARPin con afinidades en el intervalo nanomolar de un solo dígito a picomolar.

Los DARPin han sido utilizados en un amplio abanico de aplicaciones, incluyendo ELISA, ELISA de tipo sándwich, análisis de citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones de chip, purificación de afinidad o transferencia de Western. Los DARPin también han demostrado ser altamente activos en el compartimento intracelular, por ejemplo como proteínas marcadoras intracelulares fusionadas con proteína fluorescente verde (GFP). Los DARPin han sido utilizados además para inhibir la entrada vírica con IC₅₀ en el intervalo de pM. Los DARPin no sólo resultan ideales para bloquear las interacciones proteína-proteína, sino que también inhiben enzimas. Las proteasas, quinasas y transportadores han sido inhibidos con éxito, con mayor frecuencia en un modo de inhibición alostérico. Unos enriquecimientos muy rápidos y específicos en el tumor y proporciones de tumor a sangre muy favorables convierten a los DARPin en idóneos para enfoques diagnósticos o terapéuticos *in vivo*.

Puede encontrarse información adicional respecto a los DARPin y otras tecnologías de DARP en la solicitud publicada de patente US nº 2004/0132028 y en la solicitud publicada de patente internacional nº WO02/20565.

Producción de anticalinas contra DLL3

Las anticalinas son una tecnología adicional de mimético de anticuerpo; sin embargo, en este caso la especificidad de unión se deriva de lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que se expresan natural y abundantemente en tejidos y líquidos corporales humanos. Las lipocalinas se han desarrollado para realizar un abanico de funciones *in vivo* asociadas al transporte y almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas presentan una estructura intrínseca robusta que comprende un barril β altamente conservado que soporta cuatro bucles en un extremo de la proteína. Estos bucles forman la entrada a un bolsillo de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula explican la variación de especificidad de unión entre lipocalinas individuales.

Aunque la estructura global de los bucles hipervariables soportados por un marco de lámina β conservado recuerda a las inmunoglobulinas, las lipocalinas difieren considerablemente de los anticuerpos en términos de tamaño, al estar compuestos de una única cadena polipeptídica de 160 a 180 aminoácidos, que es ligeramente superior a un único dominio de inmunoglobulina.

Las lipocalinas se clonan y sus bucles se someten a manipulación a fin de crear anticalinas. Se han generado bibliotecas de anticalinas estructuralmente diversas y la expresión de anticalinas permite la selección y cribado de la función de unión, seguido de la expresión y producción de proteína soluble para el análisis adicional en sistemas procarióticos o eucarióticos. Algunos estudios han demostrado con éxito que pueden desarrollarse anticalinas que son específicas para virtualmente cualquier proteína diana humana; pueden aislarse y pueden obtenerse afinidades de unión en el intervalo nanomolar o superior.

Las anticalinas también pueden formatearse como proteínas de localización duales, denominadas duocalinas. Una duocalina se une a dos dianas terapéuticas separadas en una proteína monomérica producida fácilmente utilizando procedimientos de fabricación estándares, conservando simultáneamente especificidad y afinidad de diana con independencia de la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

La modulación de múltiples dianas mediante una única molécula resulta particularmente ventajosa en enfermedades que es conocido que implican más de un único factor causativo. Además, los formatos de unión bivalentes o multivalentes, tales como las duocalinas, presentan un potencial significativo en la localización de moléculas de superficie celular en enfermedades, mediando en efectos agonistas sobre las rutas de transducción de señales o induciendo efectos de internalización mediante la unión y agregación de receptores de superficie celular. Adicionalmente, la elevada estabilidad intrínseca de las duocalinas es comparable a la de las anticalinas monoméricas, por lo que ofrece una formulación y potencial de administración flexibles a las duocalinas.

Puede encontrarse información adicional sobre las anticalinas en la patente US nº 7.250.297 y en la solicitud publicada de patente internacional nº WO 99/16873.

Producción de avímeros contra DLL3

Los avímeros se han desarrollado a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos mediante intercambio de exones *in vitro* y expresión fágica, generando proteínas multidominio con propiedades de unión e inhibición. La unión de múltiples dominios de unión independientes se ha demostrado que crea aidez y resulta en una afinidad y especificidad mejoradas en comparación con proteínas convencionales de unión a epítipo único. Entre otras ventajas potenciales se incluye la producción simple y eficiente de moléculas específicas de múltiples dianas en *Escherichia coli*, y termoestabilidad y resistencia a proteasas mejoradas. Se han obtenido avímeros con afinidades subnanomolares contra una diversidad de dianas.

Puede encontrarse información adicional sobre los avímeros en las solicitudes publicadas de patente US nº 2006/0286603, nº 2006/0234299, nº 2006/0223114, nº 2006/0177831, nº 2006/0008844, nº 2005/0221384, nº 2005/0164301, nº 2005/0089932, nº 2005/0053973, nº 2005/0048512 y nº 2004/0175756.

Producción de Versabodies contra DLL3

Los Versabodies son proteínas pequeñas, de 3 a 5 kDa, con >15% de cisteínas, que forman un andamiaje de elevada densidad de disulfuros, que sustituyen el núcleo hidrofóbico que poseen las proteínas típicas. La sustitución de un gran número de aminoácidos hidrofóbicos, que comprende el núcleo hidrofóbico, por un número pequeño de disulfuros resulta en una proteína que es más pequeña, más hidrofílica (menos agregación y unión no específica), más resistentes a proteasas y al calor, y que presenta una densidad más baja de epítopos de células T, debido a que los residuos que contribuyen más a la presentación del CMH son hidrofóbicos. La totalidad de estas cuatro propiedades es bien conocido que afecta a la inmunogenicidad y juntas se espera que causen una gran reducción de la misma.

La inspiración para los Versabodies procede de los biofarmacéuticos inyectables naturales producidos por sanguijuelas, serpientes, arañas, escorpiones, caracoles y anémonas, que es conocido que muestran una inmunogenicidad inesperadamente baja. Partiendo de las familias seleccionadas de proteínas naturales, por diseño y mediante cribado, se minimiza el tamaño, hidrofobicidad, procesamiento proteolítico de antígenos y la densidad de epítopos a niveles muy inferiores a la media para las proteínas inyectables naturales.

Dada la estructura de los Versabodies, estos miméticos de anticuerpo ofrecen un formato versátil que incluye multivalencia, multiespecificidad, una diversidad de mecanismos de semivida, módulos de localización en tejidos y la ausencia de la región Fc de anticuerpo. Además, los Versabodies se fabrican en *E. coli* a altos rendimientos y debido a su hidrofiliidad y pequeño tamaño, son altamente solubles y pueden formularse a concentraciones elevadas. Los Versabodies son excepcionalmente estables frente al calor (pueden someterse a ebullición) y ofrecen una vida de almacenamiento prolongada.

Puede encontrarse información adicional sobre los Versabodies en la solicitud publicada de patente US nº 2007/0191272.

Expresión de reactivos de afinidad

Expresión de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante cualquier método conocido de la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante expresión recombinante, y se producen preferentemente mediante técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de anticuerpos, o fragmentos, derivados o análogos de los mismos, requiere la

construcción de un ácido nucleico que codifique el anticuerpo. En el caso de que la secuencia de nucleótidos del anticuerpo sea conocida, puede ensamblarse un ácido nucleico codificante del anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (p.ej., tal como se indica en Kutmeier et al., BioTechniques 17:242, 1994), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen partes de la secuencia codificante del anticuerpo, la hibridación y ligación de dichos oligonucleótidos y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados, mediante PCR.

Alternativamente, el ácido nucleico codificante del anticuerpo puede obtenerse mediante clonación del anticuerpo. En el caso de que no se encuentre disponible un clon que contenga el ácido nucleico codificante del anticuerpo particular, pero se conozca la secuencia de la molécula del anticuerpo, puede obtenerse un ácido nucleico codificante del anticuerpo a partir de una fuente adecuada (p.ej., una biblioteca de ADNc de anticuerpo o una biblioteca de ADNc generada a partir de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo) mediante amplificación por PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda oligonucleótida específica para la secuencia génica particular.

En el caso de que una molécula de anticuerpo que reconozca específicamente un antígeno particular no se encuentre disponible (o una fuente de una biblioteca de ADNc para la clonación de un ácido nucleico codificante de dicho anticuerpo), pueden generarse anticuerpos específicos para un antígeno particular mediante cualquier método conocido de la técnica, por ejemplo mediante inmunización de un animal, tal como un conejo, para generar anticuerpos policlonales o, por ejemplo, mediante la generación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, puede obtenerse un clon codificante de por lo menos la parte Fab del anticuerpo mediante cribado de bibliotecas de expresión de Fab (p.ej., tal como se indica en Huse et al., Science 246:1275-1281, 1989) para clones de fragmentos Fab que se unen al antígeno específico o mediante cribado de bibliotecas de anticuerpos (ver, p.ej., Clackson et al., Nature 352:624, 1991; Hane et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937, 1997).

Una vez se ha obtenido un ácido nucleico codificante de por lo menos el dominio variable, puede introducirse en un vector que contiene la secuencia de nucleótidos codificante de la región constante de la molécula de anticuerpo (ver, p.ej., la publicación de patente PCT nº WO 86/05807; la publicación de patente PCT nº WO 89/01036 y la patente US nº 5.122.464. También se encuentran disponibles vectores que contienen la cadena ligera o pesada completa para la coexpresión con el ácido nucleico a fin de permitir la expresión de una molécula de anticuerpo completa. A continuación, puede utilizarse el ácido nucleico codificante del anticuerpo para introducir una o más sustituciones o una o más deleciones de nucleótido necesarias para sustituir (o delecionar) el residuo o residuos de cisteína de región variable que participan en un enlace disulfuro intracadena con un residuo aminoácido que no contiene un grupo sulfhidrilo. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo mediante cualquier método conocido de la técnica para la introducción de mutaciones o deleciones específicas en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, aunque sin limitación, la mutagénesis química, la mutagénesis dirigida a sitio *in vitro* (Hutchinson et al., J. Biol. Chem. 253:6551, 1978), los métodos basados en PCT, etc.

Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:851-855, 1984; Neuberger et al., Nature 312:604-608, 1984; Takeda et al., Nature 314:452-454, 1985) mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Tal como se ha indicado *supra*, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes se derivan de diferentes especies animales, tales como las que presentan una región variable derivada de un mA b murino y una región constante de anticuerpo humano, p.ej., anticuerpos humanizados.

Una vez se ha obtenido un ácido nucleico codificante de una molécula de anticuerpo de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas. De esta manera, en la presente memoria se describen métodos para preparar DLL3 mediante la expresión de ácido nucleico que contiene las secuencias de la molécula de anticuerpo. Pueden utilizarse métodos que son bien conocidos por el experto en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de una molécula de anticuerpo y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Entre dichos métodos se incluyen, por ejemplo, técnicas *in vitro* de ADN recombinante, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1990) y Ausubel et al. (eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1998).

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas a continuación se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención.

Las células huésped utilizadas para expresar un anticuerpo recombinante de la invención pueden ser células bacterianas, tales como *Escherichia coli* o, preferentemente, células eucarióticas, especialmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa. En particular, las células de mamífero, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, tal como el elemento de promotor génico temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano son sistemas de expresión eficaces para los anticuerpos (Foecking et al., Gene 45:101, 1986; Cockett et al., BioTechnology 8:2, 1990).

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar una molécula de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de huésped de expresión representan vehículos mediante los que pueden producirse las secuencias codificantes y posteriormente purificarse, aunque también representan células que pueden, una vez transformadas o transfectadas con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar la molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, microorganismos, tales como bacterias (p.ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; levadura (p.ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (p.ej., baculovirus) que contienen las secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas por vectores de expresión víricos recombinantes (p.ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (p.ej., plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo, o sistemas de células de mamífero (p.ej., células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que alojan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (p.ej., promotor metalotioneína) o de virus de mamífero (p.ej., el promotor tardío de adenovirus, el promotor 7.5K del virus Vaccinia).

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión según el uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, en el caso de que deba producirse una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, pueden resultar deseables vectores que dirigen la expresión de niveles elevados de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Entre dichos vectores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2:1791, 1983), en el que la secuencia codificante de anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en el mismo marco con la región codificante de lacZ de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye y Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109, 1985; Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509, 1989) y similares. Los vectores pGEX también pueden utilizarse para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión- agarosa seguido de la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de corte de proteasa de trombina o factor Xa de manera que el producto génico diana clonado pueda liberarse de la fracción GST.

En un sistema de insecto, se utiliza el virus de la poliedrosis nuclear en *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor poliedrina). En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus (p.ej., un sistema de expresión adenovírico).

Tal como se ha comentado anteriormente, puede seleccionarse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones (p.ej., glucosilación) y procesamiento (p.ej., corte) de productos proteínas pueden resultar importantes para la función de la proteína.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de anticuerpos recombinantes, resulta preferente la expresión estable. Por ejemplo, pueden producirse líneas celulares que expresen establemente un anticuerpo de interés mediante la transfección de las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos del anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de un marcador seleccionable (p.ej., neomicina o higromicina) y la selección para la expresión del marcador seleccionable. Dichas líneas celulares manipuladas pueden resultar particularmente útiles en el cribado y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Los niveles de expresión de la molécula de anticuerpo pueden incrementarse mediante amplificación del vector (para una revisión, ver Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, vol. 3. (Academic Press, New York, 1987). En el caso de que un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo sea amplificable, el incremento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped incrementar el número de copias del gen marcador. Debido a que la región amplificada está asociada al gen del anticuerpo, también se incrementará la producción del anticuerpo (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257, 1983).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, en la que el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera. Alternativamente, puede utilizarse un único vector que codifique tanto polipéptidos de cadena pesada como de cadena ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debería introducirse antes de la cadena pesada a fin de evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature

322:52, 1986; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197, 1980). Las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez se ha expresado recombinantemente la molécula de anticuerpo de la invención, puede purificarse mediante cualquier método conocido de la técnica de purificación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo mediante cromatografía (p.ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, tal como con proteína A o antígeno específico, y cromatografía de columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

Alternativamente, puede purificarse fácilmente cualquier proteína de fusión mediante la utilización de un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se está expresando. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht et al. Permite la fácil purificación de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897, 1991). En dicho sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de Vaccinia, de manera que el marco de lectura abierto del gen se fusiona traduccionalmente con una etiqueta aminoterminal que consiste en seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como dominio de unión a matriz para la proteína de fusión. Se cargan extractos de las células infectadas por virus Vaccinia recombinante en columnas de Ni²⁺ ácido nitriloacético-agarosa y se eluyen selectivamente proteínas etiquetadas con histidina utilizando tampones que contienen imidazol.

Los anticuerpos que se generan mediante dichos métodos a continuación pueden seleccionarse en primer lugar cribando para afinidad y especificidad para el polipéptido de interés purificado y, si resulta necesario, comparando los resultados con la afinidad y la especificidad de los anticuerpos con polipéptidos que se desea excluir de la unión. El procedimiento de cribado puede implicar la inmovilización de los polipéptidos purificados en pocillos separados de placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo o grupos de anticuerpos potenciales a continuación se introduce en los pocillos de microtitulación respectivos y se incuba durante aproximadamente 30 min a 2 h. A continuación, los pocillos de microtitulación se lavan y se añade un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo antiraton conjugado con fosfatasa alcalina en el caso de que los anticuerpos generados sean anticuerpos de ratón) a los pocillos durante aproximadamente 30 min y después se lavan. Se añade sustrato a los pocillos y aparecerá una reacción de color en donde se encuentra presente anticuerpo contra el polipéptido o polipéptidos inmovilizados.

Los anticuerpos identificados de esta manera pueden analizarse adicionalmente para afinidad y especificidad en el diseño de ensayo seleccionado. Durante el desarrollo de los inmunoensayos para una proteína diana, la proteína diana purificada actúa como estándar a partir del que se evalúa la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo con los anticuerpos seleccionados. Debido a que la afinidad de unión de los diversos anticuerpos puede diferir, determinadas parejas de anticuerpos (p.ej., en ensayos de tipo sándwich) pueden interferir unos con otros estéricamente, etc.; el rendimiento del ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad y especificidad absolutas de un anticuerpo.

El experto en la materia reconocerá que pueden adoptarse muchos enfoques para producir anticuerpos o fragmentos de unión y para el cribado y selección para afinidad y especificidad de los diversos polipéptidos, aunque estos enfoques no modifican el alcance de la invención.

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos (particularmente los anticuerpos monoclonales) pueden ser convenientemente anticuerpos humanos o animales humanizados (p.ej., de ratón). Pueden generarse anticuerpos animales en animales utilizando la proteína humana (p.ej., DLL3) como inmunógeno. La humanización típicamente implica la injertación de CDR identificados de esta manera en regiones marco humanas. Normalmente, se requiere alguna retromutación posterior para optimizar la conformación de las cadenas. Dichos procedimientos son conocidos por el experto en la materia.

Expresión de anticuerpos

La construcción de anticuerpos se ha descrito en otras publicaciones (Ronnmark J, Gronlund H, Uhlen, M., Nygren P.A, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655, 2002), incluyendo la construcción de bibliotecas de expresión fágica de anticuerpos (Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhlen, M. & Nygren, P.A, A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain, Protein Eng. 8, 601-608, 1995. Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. & Nygren, P.A, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain, Nat. Biotechnol. 15, 772-777, 1997)

Los análisis de biosensores para investigar las variantes de anticuerpo óptimas utilizando estudios de unión con biosensores también se han descrito en otras publicaciones (Ronnmark J, Gronlund H, Uhlen, M., Nygren P.A, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655, 2002).

Modificaciones con reactivo de afinidad

En una realización preferente, se conjugan reactivos de afinidad anti-DLL3, tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos, con una fracción diagnóstica (tal como un marcaje detectable) o una fracción terapéutica. Los anticuerpos pueden utilizarse para el diagnóstico o para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento del anticuerpo con una sustancia detectable (marcaje). Entre los ejemplos de sustancias detectables se incluyen diversos enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radioactivos, metales emisores de positrones (para la utilización en tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. Ver generalmente la patente US nº 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para la utilización como diagnósticos según la presente invención. Entre los enzimas adecuados se incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; entre los grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina, avidina y biotina; entre los materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; entre los materiales luminiscentes adecuados se incluyen el luminol; entre los materiales bioluminiscentes adecuados se incluyen luciferasa, luciferina y acuorina, y entre los nucleidos radioactivos adecuados se incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In y ⁹⁹Tc. También puede utilizarse ⁶⁸Ga.

Tal como se ha indicado anteriormente, pueden conjugarse reactivos de afinidad, tales como anticuerpos para la utilización en la invención, con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (p.ej., un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados se denominan en la presente memoria "inmunokonjugados". Los inmunokonjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que resulte perjudicial (p.ej., que mate) células. Entre los ejemplos se incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puomicina, y análogos u homólogos de los mismos. Entre los agentes terapéuticos se incluyen además, por ejemplo, antimetabolitos (p.ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (p.ej., mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP), cisplatino), antraciclina (p.ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.ej., dactinomicina (anteriormente, actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)) y agentes antimetabólicos (p.ej., vincristina y vinblastina).

Entre otros ejemplos preferentes de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención se incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatina, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de caliqueamicina-anticuerpo se encuentra disponible comercialmente (Mylotarg®; American Home Products).

Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos de la invención utilizando tecnología de conectores disponible en la técnica. Entre los ejemplos de tipos de conector que se han utilizado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y conectores que contienen péptidos. Puede seleccionarse un conector que, por ejemplo, es susceptible al corte por pH bajo dentro del compartimiento lisosómico o que es susceptible de corte por proteasas, tal como proteasas que se expresan preferentemente en tejido tumoral, tal como catepsinas (p.ej., las catepsinas B, C y D).

Se indican ejemplos de citotoxinas en, por ejemplo, las patentes US nº 6.989.452, nº 7.087.600 y nº 7.129.261 y en las publicaciones de patente PCT nº WO02/096910A1, nº WO2005/112919A2, nº WO2007/038658A2, nº WO2007/051081A1, nº WO2007/059404A2, y nº WO2006/110476, y en la solicitud de patente US nº 60/891.028. Para un comentario adicional de los tipos de citotoxina, conectores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, ver también Saito G. et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215, 2003; Trail, P.A. et al. Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337, 2003; Payne, G., Cancer Cell 3:207-212, 2003; Allen, T.M. Nat. Rev. Cancer 2:750-763, 2003; Pastan, I. y Kreitman, R. J., Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091, 2003; Senter, P.D. y Springer, C.J. Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264, 2001.

Los reactivos de afinidad también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados radioinmunokonjugados. Entre los ejemplos de isótopos radioactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para la utilización diagnóstica o terapéuticamente se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, yodo-131, iridio-111, itrio-90 y lutecio-177. Los métodos para preparar radioinmunokonjugados se encuentran establecidos en la técnica. Se encuentran disponibles comercialmente ejemplos de radioinmunokonjugados, incluyendo Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y pueden utilizarse métodos similares para preparar radioinmunokonjugados utilizando los anticuerpos de la invención.

Los reactivos de afinidad también pueden conjugarse con un pigmento de ftalocianina denominado a continuación en la presente memoria como conjugados de ftalocianina. Entre los ejemplos de pigmentos de ftalocianina que pueden conjugarse con anticuerpos para la utilización diagnóstica o terapéuticamente se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, IR700. Los métodos para preparar conjugados de ftalocianina se describen en, por ejemplo, Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL and Kobayashi H, Nat. Med. 6 de nov., 2011. doi: 10.1038/nm.2554.

Los conjugados pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada y la fracción fármaco no debe interpretarse como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Entre dichas proteínas pueden incluirse, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína, tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ , o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento. Senter P.D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(3):235-244, 2009; Kovtun et al. *Cancer Res.* 70(6):2528-2537, 2010.

Las técnicas para conjugar dichas fracciones terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas; ver, p.ej., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en: *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), páginas 243 a 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en: *Controlled Drug Delivery* (2a ed.), Robinson et al. (eds.), páginas 623 a 53 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en: *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), páginas 475 a 506, 1985; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabelled Antibody In Cancer Therapy", en: *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), páginas 303 a 16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58, 1982.

Alternativamente, puede conjugarse un anticuerpo con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos tal como se indica en Segal, en la patente US nº 4.676.980.

Puede utilizarse un anticuerpo con o sin una fracción terapéutica conjugada con el mismo a modo de terapéutico que se administra solo o en combinación con uno o más factores citotóxicos y/o una o más citoquinas.

La invención proporciona además anticuerpos totalmente humanos o humanizados que inducen citotoxicidad mediada por células dirigida por anticuerpos (ADCC). Un anticuerpo totalmente humano es uno en el que las secuencias proteicas están codificadas por secuencias de inmunoglobulina humana de origen natural, de linfocitos B humanos aislados productores de anticuerpos, o de linfocitos B murinos transgénicos de ratones en los que se han sustituido las regiones cromosómicas codificantes de la inmunoglobulina murina por secuencias humanas ortólogas. Entre los anticuerpos transgénicos de este último tipo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, HuMab (Medarex, Inc., CA) y XenoMouse (Abgenic Inc., CA). Un anticuerpo humanizado es uno en el que la región constante de una molécula de anticuerpo no humana de especificidad de antígeno apropiada se sustituye por la región constante de un anticuerpo humano, preferentemente del subtipo IgG, con funciones efectoras apropiadas (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855, 1984; Neuberger et al., *Nature* 312:604-608, 1984; Takeda et al., *Nature* 314:452-454, 1985). Entre las funciones efectoras apropiadas se incluyen la ADCC, que es un proceso natural por el que los anticuerpos totalmente humanos o los anticuerpos humanizados, al unirse a dianas sobre la superficie de las células de cáncer, activan las propiedades de eliminación celular de los linfocitos que son parte del sistema inmunitario normal. Dichos linfocitos activos, denominados células asesinas naturales (NK), utilizando un proceso citotóxico para destruir las células vivas a las que se encuentran unidos los anticuerpos. La actividad de ADCC puede detectarse y cuantificarse mediante la medición de la liberación de europio (Eu^{3+}) a partir de células vivas marcadas con Eu^{3+} en presencia de un anticuerpo específico de antígeno y células mononucleares de sangre periférica extraídas de un sujeto humano vivo inmunocompetente. El proceso de la ADCC se describe en detalle en Janeway Jr. C.A. et al., *Immunobiology*, 5a ed., Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X, 2001; Pier G.B. et al., *Immunology, Infection, and Immunity*, p246-5, 2004; Albanell J. et al., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 532:p2153-68, 2003 y Weng, W.-K. et al., *Journal of Clinical Oncology*, 21:p 3940-3947, 2003. Pueden encontrarse métodos adecuados para la detección y cuantificación de la ADCC en Blomberg et al., *Journal of Immunological Methods*. 86:p225-9, 1986; Blomberg et al., *Journal of Immunological Methods*. 21;92:p117-23, 1986 y Patel y Boyd, *Journal of Immunological Methods*. 184:P29-38, 1995.

La ADCC típicamente implica la activación de células NK y es dependiente del reconocimiento de células recubiertas de anticuerpos por receptores de Fc sobre la superficie de la célula NK. Los receptores de Fc reconocen la parte Fc (cristalina) de los anticuerpos, tales como IgG, unidos específicamente a la superficie de una célula diana. El receptor de Fc que induce la activación de la célula NK se denomina CD16 o Fc γ RIIIa. Una vez el receptor de Fc γ RIIIa se ha unido a Fc de IgG, la célula NK libera citoquinas, tales como IFN- γ y gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas que entran en la célula diana y estimulan la muerte celular mediante la inducción de apoptosis.

La inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por un anticuerpo puede potenciarse mediante modificaciones que alteran las interacciones entre la región constante de anticuerpo (Fc) y diversos receptores que están presentes sobre la superficie de las células del sistema inmunitario. Entre dichas modificaciones se incluyen la reducción o ausencia de fracciones de fucosa unidas mediante alfa-1,6 en las cadenas de oligosacárido complejo que se añaden normalmente a Fc de anticuerpos durante la síntesis natural o recombinante en células de mamífero. En una realización preferente, se producen reactivos de afinidad anti-DLL3 no fucosilados, tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos, con el fin de potenciar su capacidad de inducir la respuesta de ADCC.

Las técnicas para reducir o anular las fracciones de fucosa unidas mediante enlace alfa-1,6 en las cadenas de oligosacárido de Fc se encuentran bien establecidas. En un ejemplo, se sintetiza el anticuerpo recombinante en una línea celular en la que se encuentra deteriorada su capacidad de añadir fucosa mediante enlace alfa-1,6 a la N-acetilglucosamina más interior de los oligosacáridos Fc de tipo complejo biantenarios unidos mediante enlace N-glucosídico. Entre dichas líneas celulares se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, el hibridoma YB2/0 de rata, que expresa un nivel reducido del gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8. Preferentemente, el anticuerpo se sintetiza en una línea celular que es incapaz de añadir fracciones de fucosilo unidas mediante enlace alfa-1,6 a cadenas oligosacáridas complejas, debido a la delección de ambas copias del gen FUT8. Entre dichas líneas celulares se incluyen, aunque sin limitación, las líneas celulares FUT8^{-/-} CHO/DG44. Las Técnicas para la síntesis de anticuerpos parcialmente fucosilados o no fucosilados y reactivos de afinidad se describen en Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278:3466-34735, 2003; Yamane-Ohnuki et al., Biotechnology and Bioengineering 87: 614-22, 2004 y en los documentos nº WO00/61739 A1, nº WO02/31140 A1 y nº WO03/085107 A1. En un segundo ejemplo, la fucosilación de un anticuerpo recombinante se reduce o se anula mediante síntesis en una línea celular que ha sido genéticamente manipulada para sobreexpresar una glucosiltransferasa modificadora de glucoproteína a un nivel que maximice la producción de oligosacáridos en enlace N-glucosídico complejos que portan N-acetilglucosamina bisectada. Por ejemplo, el anticuerpo se sintetiza en una línea celular de ovario de hamster chino que expresa el enzima N-acetilglucosamina transferasa III (GnT III). Las líneas celulares establemente transfectadas con glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteína adecuadas y los métodos de síntesis de anticuerpo que utilizan dichas células se describen en el documento nº WO99/54342.

Puede utilizarse un anticuerpo no fucosilado o reactivo de afinidad como terapéutico que se administra solo o en combinación con uno o más factores citotóxicos y/o una o más citoquinas.

En una modificación adicional, las secuencias de aminoácidos del Fc anticuerpo se alteran de una manera que potencia la activación de ADCC, sin afectar a la afinidad del ligando. Se describen ejemplos de dichas modificaciones en Lazar et al., Proceedings of the National Academy of Sciences 103: p4005-4010, 2006; documentos nº WO03/074679 y nº WO2007/039818. En dichos ejemplos, la sustitución de aminoácidos en Fc de anticuerpo, tal como aspartato por serina en la posición 239, e isoleucina por glutamato en la posición 332, altera la afinidad de unión de un anticuerpo para receptores de Fc, conduciendo a un incremento de la activación de ADCC.

Un reactivo de anticuerpo con activación de ADCC potenciada debido a sustituciones de aminoácidos puede utilizarse como terapéutico que se administra solo o en combinación con uno o más factores citotóxicos y/o una o más citoquinas.

La invención proporciona además moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para un primer epítipo diana (es decir, DLL3) y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana según se caracteriza mediante las reivindicaciones adjuntas. El segundo epítipo diana puede encontrarse presente en la misma proteína diana que a la que se une la primera especificidad de unión, o el segundo epítipo diana puede encontrarse presente de una proteína diana diferente a la que se une la primera proteína que la que se une a la primera especificidad de unión. El segundo epítipo diana puede encontrarse presente en la misma célula que el primer epítipo diana (es decir, DLL3), o el segundo epítipo diana puede encontrarse presente en una diana que no expresa la célula que expresa el primer epítipo diana. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "especificidad de unión" se refiere a una fracción que comprende por lo menos un dominio variable de anticuerpo.

En una realización, la molécula biespecífica es un BiTE (acoplador biespecífico de células T). En particular, la invención proporciona un reactivo de afinidad biespecífico (preferentemente un anticuerpo biespecífico) que comprende un primer dominio de unión a DLL3 y un segundo dominio de unión a un antígeno de la célula T, preferentemente CD3.

Dichas moléculas biespecíficas dirigen células expresantes de DLL3 a células efectoras expresantes de CD3 (p.ej., células T citotóxicas expresantes de CD3) e inducen actividades celulares efectoras mediadas por CD3, tales como la expansión clonal de células T y la citotoxicidad de células T. Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden presentar un total de dos o tres dominios variables de anticuerpo, en el que la primera parte del anticuerpo biespecífico es capaz de atraer la actividad de una célula efectora inmunitaria humana mediante la unión específica a un antígeno efector localizado sobre la célula efectora inmunitaria humana, en la que el antígeno efector es el antígeno CD3 humano, consistiendo dicha primera parte en un dominio variable de anticuerpo y una segunda parte del anticuerpo biespecífico es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana diferente del antígeno efectora, p.ej., DL3, estando localizada dicho antígeno diana en una célula diana diferente de dicha célula efectora inmunitaria humana, y comprendiendo dicha segunda parte, uno o dos dominios variables de anticuerpo.

En una realización preferente, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico (preferentemente un BiTE) que se une a DLL3 y a CD3 para el tratamiento del cáncer de pulmón, preferentemente el cáncer de pulmón de células pequeñas.

Diagnóstico de cáncer, incluyendo las enfermedades de la invención

Según otro aspecto, se proporciona un método de detección, diagnóstico y/o cribado o monitorización de la progresión del cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, o de monitorización del efecto de, p.ej., un fármaco o terapia anticáncer dirigido contra las enfermedades de la invención en un sujeto, que comprende detectar la presencia o el nivel de anticuerpos capaces de unión inmuno-específica a DLL3 o uno o más fragmentos que contienen epítipo de los mismos, o que comprende detectar un cambio en el nivel de los mismos en dicho sujeto.

Según otro aspecto, se proporciona además un método de detección, diagnóstico y/o cribado para cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, en un sujeto, que comprende detectar la presencia de anticuerpos capaces de unión inmuno-específica a DLL3, o uno o más fragmentos que contienen epítipo de los mismos en dicho sujeto, en el que: (a) la presencia de un nivel elevado de anticuerpos capaces de unión inmuno-específica a DLL3 o dicho fragmento o fragmentos que contienen epítipo de los mismos en dicho sujeto en comparación con el nivel en un sujeto sano, o (b) la presencia de un nivel detectable de anticuerpos capaces de unión inmuno-específica a DLL3 o dicho fragmento o fragmentos que contienen epítopos en dicho sujeto en comparación con un nivel indetectable correspondiente en un sujeto sano indica la presencia de dicho cáncer en dicho sujeto.

Un método particular de detección, diagnóstico y/o cribado para cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, comprende:

poner en contacto DLL3, o uno o más fragmentos que contienen epítopos del mismo, con una muestra biológica que debe someterse a ensayo, y
detectar la presencia de anticuerpos en el sujeto capaces de unión inmuno-específica a DLL3 o uno o más fragmentos que contienen epítopos del mismo.

Según otro aspecto, se proporciona un método de monitorización de la progresión del cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención o de monitorización del efecto de, p.ej., un fármaco o terapia anticáncer dirigido contra las enfermedades de la invención en un sujeto, que comprende detectar la presencia de anticuerpos capaces de unión inmuno-específica a DLL3, o uno o más fragmentos que contienen epítopos de los mismos en dicho sujeto en un primer punto temporal y en un punto temporal posterior, la presencia de un nivel elevado o reducido de anticuerpos capaces de unión inmuno-específica a DLL3, o uno o más fragmentos que contienen epítopos del mismo, en dicho sujeto en el punto temporal posterior en comparación con el nivel en dicho sujeto en dicho primer punto temporal, indicando la progresión o la regresión de dicho cáncer, o el efecto o no efecto de dicho fármaco o terapia anticáncer en dicho sujeto.

La presencia de anticuerpos capaces de unión inmuno-específica a DLL3 o uno o más fragmentos que contienen epítopos del mismo se detecta típicamente mediante análisis de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto (se han mencionado anteriormente muestras biológicas ejemplares, p.ej., la muestra es una muestra de tejido de pulmón, páncreas y piel, o alternativamente es una muestra de sangre o saliva). El método típicamente incluye la etapa de obtener dicha muestra biológica para el análisis a partir de dicho sujeto. Entre los anticuerpos que pueden detectarse se incluyen anticuerpos IgA, IgM e IgG.

Según la presente invención, las muestras de ensayo de, p.ej., tejido de pulmón, páncreas o piel, suero, plasma u orina obtenidas de un sujeto que se sospecha que presenta, o que se conoce que presenta las enfermedades de la invención, puede utilizarse para el diagnóstico o la monitorización. En una realización, un cambio en la abundancia de DLL3 en una muestra de ensayo respecto a una muestra de control (procedente de un sujeto o sujetos libres de las enfermedades de la invención) o un intervalo de referencia previamente determinado, indica la presencia de las enfermedades de la invención. En otra realización, la abundancia relativa de DLL3 en una muestra de ensayo en comparación con una muestra de control o un intervalo de referencia previamente determinado indica un subtipo de las enfermedades de la invención (p.ej., carcinoma de células pequeñas, carcinoma pulmonar de células escamosas, tumores endocrinos del páncreas o carcinoma de piel de células escamosas o melanoma). En todavía otra realización, la abundancia relativa de DLL3 en una muestra de ensayo respecto a una muestra de control o un intervalo de referencia previamente determinado indica el grado o severidad de las enfermedades de la invención (p.ej., la probabilidad de metástasis). En cualquiera de los métodos anteriormente indicados, la detección de DLL3 puede combinarse opcionalmente con la detección de uno o más biomarcadores adicionales de las enfermedades de la invención. Puede utilizarse cualquier método de la técnica para medir el nivel de DLL3, incluyendo, aunque sin limitación, las Tecnologías preferentes indicadas en la presente memoria, ensayos de quinasas, inmunoensayos para detectar y/o visualizar DLL3 (p.ej., transferencia de Western, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida, inmunocitoquímica, etc.). En una realización adicional, un cambio en la abundancia de ARNm codificante de DLL3 en una muestra de ensayo respecto a una muestra de control o un intervalo de referencia previamente determinado indica la presencia de las enfermedades de la invención. Puede utilizarse cualquier ensayo de hibridación adecuado para detectar la expresión de DLL3 mediante la detección y/o visualización de ARNm codificante de DLL3 (p.ej., ensayos Northern, transferencias de puntos, hibridación *in situ*, etc.).

En otra realización, pueden utilizarse anticuerpos marcados (u otros reactivos de afinidad), derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente a DLL3, con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar o monitorizar las

enfermedades de la invención. Preferentemente, las enfermedades de la invención se detectan en un animal, más preferentemente en un mamífero y lo más preferentemente en un ser humano.

Ensayos de cribado

En la presente memoria se describen métodos para identificar agentes de identificación (p.ej., compuestos candidatos o compuestos de ensayo) que se unen a DLL3 o presentan un efecto estimulante o inhibidor de la expresión o actividad de DLL3. En la presente memoria se describen además métodos de identificación de agentes, compuestos candidatos o compuestos de ensayo que se unen a un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3 o que presentan un efecto estimulante o inhibidor de la expresión o actividad de un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3. Entre los ejemplos de agentes, compuestos candidatos o compuestos de ensayo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ácidos nucleicos (p.ej., ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. Pueden obtenerse agentes utilizando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatorial conocidos de la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas, bibliotecas paralelas de fase sólida o en fase solución espacialmente localizables, métodos de biblioteca sintética que requieren desconvolución, el método de biblioteca "una perla un compuesto", y métodos de biblioteca sintética utilizando la selección mediante cromatografía de afinidad. El enfoque de biblioteca biológica está limitado a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos péptidos, oligómeros no péptídicos o de molécula pequeña (Lam, *Anticancer Drug Des.* 12:145, 1997; patentes US nº 5.738.996 y nº 5.807.683.

Pueden encontrarse ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la literatura, por ejemplo en: DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909, 1993; Erb et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37:2678, 1994; Cho et al., *Science* 261:1303, 1993; Carrell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059, 1994; Carrell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061, 1994 y Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37:1233, 1994.

Pueden presentarse bibliotecas de compuestos, p.ej., en solución (p.ej., Houghten, *BioTechniques* 13:412-421, 1992), o sobre perlas (Lam, *Nature* 354:82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364:555-556, 1993), bacteria (patente US nº 5.223.409), esporas (patentes nº 5.571.698; nº 5.403.484 y nº 5.223.409), plásmidos (Cull et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869, 1992) o fago (Scott and Smith, *Science* 249:386-390, 1990; Devlin, *Science* 249:404-406, 1990; Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382, 1990 y Felici, *J. Mol. Biol.* 222:301-310, 1991).

En una realización, los agentes que interactúan con (es decir, se unen a) DLL3, un fragmento de DLL3 (p.ej., un fragmento funcionalmente activo), un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3, se identifican en un sistema de ensayo basado en células. Según dicha realización, las células que expresan DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento del polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3 se ponen en contacto con un compuesto candidato o un compuesto de control y se determina la capacidad del compuesto candidato de interactuar con DLL3. Si se desea, dicho ensayo puede utilizarse para cribar una pluralidad (p.ej., una biblioteca) de compuestos candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen procariótico (p.ej., *E. coli*) o de origen eucariótico (p.ej., levaduras o de mamífero). Además, las células pueden expresar DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento del polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3 endógenamente, o manipularse genéticamente para expresar DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento del polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3. En determinados casos, DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento del polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3 o el compuesto candidato se marcan, por ejemplo, con un marcaje radioactivo (tal como ³²P, ³⁵S y ¹²⁵I) o un marcaje fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre DLL3 y un compuesto candidato. La capacidad del compuesto candidato de interactuar directa o indirectamente con DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3 puede determinarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la interacción entre un compuesto candidato y DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3 puede determinarse mediante citometría de flujo, un ensayo de centelleo, inmunoprecipitación o análisis de transferencia de Western.

En otra realización, los agentes que interactúan con (es decir, se unen a) DLL3, un fragmento de DLL3 (p.ej., un fragmento funcionalmente activo), un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3 se identifican en un sistema de ensayo libre de células. Según dicha realización, DLL3 nativo o recombinante o un fragmento del mismo, o un polipéptido relacionado con DLL3 nativo o recombinante o fragmento del mismo, o una proteína de fusión de DLL3 o fragmento de la misma, se pone en contacto con un compuesto candidato o un compuesto de control, y se determina la capacidad del compuesto candidato de interactuar con DLL3 o polipéptido relacionado con DLL3, o proteína de fusión de DLL3. Si se desea, dicho ensayo puede utilizarse para cribar una pluralidad (p.ej., una biblioteca) de compuestos candidatos. Preferentemente, DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3 en primer lugar se inmoviliza mediante, por ejemplo, la puesta en contacto de DLL3,

un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3 con un anticuerpo inmovilizado (u otro reactivo de afinidad) que reconoce específicamente y se une al mismo, o mediante el contacto de una preparación purificada de DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3 con una superficie diseñada para la unión a proteínas. DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3 puede purificarse parcial o completamente (p.ej., parcial o completamente libre de otros polipéptidos) o ser parte de un lisado celular. Además, DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3 puede ser una proteína de fusión que comprende DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo, o un polipéptido relacionado con DLL3 y un dominio, tal como glutatión-S-transferasa. Alternativamente, DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3 puede biotinilarse utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la materia (p.ej., un kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL). La capacidad del compuesto candidato de interactuar con DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3 puede determinarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia.

En otra realización, se utiliza un sistema de ensayo basado en células para identificar agentes que se unen o modulan la actividad de una proteína, tal como un enzima, o una parte biológicamente activa del mismo, que es responsable de la producción o degradación de DLL3 o es responsable de la modificación post-traducciona de DLL3. En un cribado primario, se pone en contacto una pluralidad (p.ej., una biblioteca) de compuestos con células que expresan natural o recombinantemente: (i) DLL3, una isoforma de DLL3, un homólogo de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, una proteína de fusión de DLL3, o un fragmento biológicamente activo de cualquiera de los anteriores, y (ii) una proteína que es responsable del procesamiento de DLL3, una isoforma de DLL3, un homólogo de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, una proteína de fusión de DLL3 o un fragmento a fin de identificar compuestos que modulan la producción, degradación o modificación post-traducciona de DLL3, una isoforma de DLL3, un homólogo de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, una proteína de fusión de DLL3 o fragmento. Si se desea, los compuestos identificados en el cribado primario a continuación pueden someterse a ensayo en un cribado secundario frente a células que natural o recombinantemente expresan DLL3. La capacidad del compuesto candidato de modular la producción, degradación o modificación post-traducciona de una isoforma u homólogo de DLL3, polipéptido relacionado con DLL3 o proteína de fusión de DLL3 puede determinarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitación, citometría de flujo, un ensayo de centelleo, inmunoprecipitación y análisis de transferencia de Western.

En otra realización, se identifican compuestos que interactúan competitivamente (es decir, se unen) a DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3, en un ensayo de unión competitiva. Según dicha realización, las células que expresan DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3, se ponen en contacto con un compuesto candidato y un compuesto que es conocido que interactúa con DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3; a continuación, se determina la capacidad del compuesto candidato de interactuar preferentemente con DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3. Alternativamente, se identifican los agentes que interactúan preferentemente (es decir, se unen) a DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido o fragmento relacionado con DLL3 de un polipéptido relacionado con DLL3, en un sistema de ensayo libre de células mediante la puesta en contacto de DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3 con un compuesto candidato y un compuesto que es conocido que interactúa con DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3 o una proteína de fusión de DLL3. Tal como se ha indicado anteriormente, la capacidad del compuesto candidato de interactuar con DLL3, un fragmento de DLL3, un polipéptido relacionado con DLL3, un fragmento de un polipéptido relacionado con DLL3, o una proteína de fusión de DLL3, puede determinarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Estos ensayos, basados en células o libres de células, pueden utilizarse para cribar una pluralidad (p.ej., una biblioteca) de compuestos candidatos.

En otra realización, los agentes que modulan (es decir, regulan positiva o negativamente) la expresión o actividad de DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3 se identifican poniendo en contacto células (p.ej., células de origen procariótico o de origen eucariótico) que expresan DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3 con un compuesto candidato o un compuesto de control (p.ej., solución salina tamponada con fosfato (PBS)) e identificando la expresión de DLL3, polipéptido relacionado con DLL3 o proteína de fusión de DLL3, ARNm codificante de DLL3 o ARNm codificante del polipéptido relacionado con DLL3. El nivel de expresión de DLL3, polipéptido relacionado con DLL3, ARNm codificante de DLL3 o ARNm codificante del polipéptido relacionado con DLL3 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión de DLL3, polipéptido relacionado con DLL3, ARNm codificante de DLL3 o ARNm codificante del polipéptido relacionado con DLL3 en ausencia del compuesto candidato (p.ej., en presencia de un compuesto de control). A continuación, el compuesto candidato puede identificarse como un modulador de la expresión de DLL3 o el polipéptido relacionado con DLL3 basándose en dicha comparación. Por ejemplo, en el caso de que la expresión de DLL3 o ARNm sea significativamente superior en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, se identifica el compuesto candidato como estimulador de la expresión de DLL3 o

ARNm. Alternativamente, en el caso de que la expresión de DLL3 o ARNm sea significativamente inferior en presencia del compuesto candidato que, en su ausencia, se identifica el compuesto candidato como un inhibidor de la expresión de DLL3 o ARNm. El nivel de expresión de DLL3 o del ARNm que lo codifica puede determinarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la expresión de ARNm puede evaluarse mediante análisis de transferencia Northern o RT-PCR y los niveles de proteína pueden evaluarse mediante análisis de transferencia de Western.

En otra realización, los agentes que modulan la actividad de DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3 se identifican poniendo en contacto una preparación que contiene DLL3 o polipéptido relacionado con DLL3 o células (p.ej., células procarióticas o eucarióticas) que expresan DLL3 o polipéptido relacionado con DLL3 con un compuesto de ensayo o un compuesto de control y determinando la capacidad del compuesto de ensayo de modular (p.ej., de estimular o inhibir) la actividad de DLL3 o de un polipéptido relacionado con DLL3. La actividad de DLL3 o de un polipéptido relacionado con DLL3 puede evaluarse mediante la detección de la inducción de una ruta de transducción de señales celulares de DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3 (p.ej., Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), la detección de actividad catalítica o enzimática de la diana sobre un sustrato adecuado, la detección de la inducción de un gen informador (p.ej., un elemento regulador que es sensible a DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3 y está operablemente ligado a un ácido nucleico codificante de un marcador detectable, p.ej., luciferasa) o la detección de una respuesta celular, por ejemplo la diferenciación celular o la proliferación celular. Basándose en la presente descripción, pueden utilizarse técnicas conocidas por el experto en la materia para medir dichas actividades (ver, p.ej., la patente US nº 5.401.639). A continuación, puede identificarse el compuesto candidato como modulador de la actividad de DLL3 o de un polipéptido relacionado con DLL3 mediante la comparación de los efectos del compuesto candidato con los del compuesto de control. Entre los compuestos de control adecuados se incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS) y solución salina normal (NS).

En otra realización, los agentes que modulan (es decir, regulan positiva o negativamente) la expresión, actividad o ambas, la expresión y la actividad, de DLL3 o de un polipéptido relacionado con DLL3, se identifican en un modelo animal. Entre los ejemplos de animales adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ratones, ratas, conejos, monos, cobayas, perros y gatos. Preferentemente, el animal utilizado representa un modelo de las enfermedades de la invención (p.ej., xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas, tales como NCI-H345; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, tales como A549 y H460; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer pancreático, tales como MIA PaCa-2 en ratones desnudos, Marincola et al., J. Surg. Res. 47(6):520-9, dic. De 1989 o xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de piel, tales como MV3 en ratones desnudos; van Muijen et al., Int. J. Cancer 48(1):85-91; 22 de abril, 1991). Estos pueden utilizarse para someter a ensayo compuestos que modulan los niveles de DLL3, ya que la patología mostrada en dichos modelos es similar a la de, p.ej., las enfermedades de la invención. Según la presente realización, el compuesto de ensayo o un compuesto de control se administra (p.ej., por vía oral, rectal o parenteral, tal como por vía intraperitoneal o intravenosa) en un animal adecuado y se determina el efecto sobre la expresión, actividad o ambas, la expresión y la actividad, de DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3. Los cambios en la expresión de DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3 pueden evaluarse mediante los métodos descritos de manera general anteriormente.

En todavía otra realización, se utiliza DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3 como "proteína señuelo" en un ensayo de dos híbridos o en un ensayo de tres híbridos para identificar otras proteínas que se unen o interactúan con DLL3 o con un polipéptido relacionado con DLL3 (ver, p.ej., la patente US nº 5.283.317; Zervos et al., Cell 72:223-232, 1993; Madura et al. J. Biol. Chem. 268:12046-12054, 1993; Bartel et al. BioTechniques 14:920-924, 1993; Iwabuchi et al. Oncogene 8:1693-1696, 1993 y la publicación de patente PCT nº WO 94/10300). El experto en la materia apreciará que dichas proteínas de unión también participarán probablemente en la propagación de señales mediante DLL3, tal como, por ejemplo, elementos corriente arriba o corriente abajo de una ruta de señalización que implica DLL3.

Se proporcionan además nuevos agentes identificados mediante los ensayos de cribado indicados anteriormente y usos de los mismos para los tratamientos tal como se indica en la presente memoria. Además, se proporciona además la utilización de un agente que interactúa o modula la actividad de DLL3 en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las enfermedades de la invención.

Uso terapéutico de DLL3

La invención proporciona el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades y trastornos mediante la administración de un compuesto terapéutico. Entre dichos compuestos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos: DLL3, análogos de DLL3, polipéptidos relacionados con DLL3 y derivados y variantes (incluyendo fragmentos) de los mismos; anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) de los anteriores; ácidos nucleicos codificantes de DLL3, análogos de DLL3, polipéptidos relacionados con DLL3 y fragmentos de los mismos; ácidos nucleicos antisentido respecto a un gen codificante de DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3, y modulador (p.ej., agonistas y antagonistas) de un gen codificante de DLL3 o un polipéptido relacionado con DLL3. Una característica importante de la presente invención es la identificación de genes que codifican DLL3 que participan en cánceres tales como las enfermedades de la invención. Las enfermedades de la invención, por ejemplo, pueden tratarse (p.ej., para mejorar los síntomas o para retrasar la aparición o la progresión) o prevenirse mediante la administración de un compuesto terapéutico que reduce la función o la expresión de DLL3 en el suero o en tejidos de sujetos que presentan las enfermedades de la invención.

En una realización, uno o más anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) cada uno de los cuales se une específicamente a DLL3, se administran solos o en combinación con uno o más compuestos o tratamientos terapéuticos adicionales.

Un producto biológico, tal como un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) es alogénico respecto al sujeto en el que se administra. En una realización, un DLL3 humano o un polipéptido relacionado con DLL3 humano, una secuencia de nucleótidos codificante de un DLL3 humano o de un polipéptido relacionado con DLL3 humano, o un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) de un DLL3 humano o un polipéptido relacionado con DLL3 humano, se administra en un sujeto humano para la terapia (p.ej., para aliviar los síntomas o para retrasar la aparición o la progresión) o para la profilaxis.

Sin respaldo teórico, se concibe que la actividad terapéutica de anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) que se unen específicamente a DLL3 puede conseguirse mediante el fenómeno de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (ver, p.ej., Janeway Jr. C.A. et al., Immunobiology, 5a ed., Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X, 2001; Pier G.B. et al., Immunology, Infection, and Immunity, p246-5, 2004; Albanell J. et al., Advances in Experimental Medicine and Biology 532:p2153-68, 2003, y Weng, W-K. et al., Journal of Clinical Oncology 21:p 3940-3947, 2003).

Tratamiento y prevención de las enfermedades de la invención

Las enfermedades de la invención, por ejemplo, se tratan o se previenen mediante la administración en un sujeto que se sospecha que presenta o que es conocido que presenta una o más de las enfermedades de la invención o que está en riesgo de desarrollar una o más de las enfermedades de la invención, de un compuesto que modula (es decir, incrementa o reduce) el nivel o la actividad (es decir, la función) de DLL3 que se encuentra diferencialmente presente en el suero o tejido de sujetos que presentan una o más de las enfermedades de la invención en comparación con suero o tejido de sujetos libres de las enfermedades de la invención. En una realización, las enfermedades de la invención se tratan o se previenen mediante la administración en el sujeto que se sospecha que presenta o que es conocido que presenta una o más de las enfermedades de la invención, o que está en riesgo de desarrollar las enfermedades de la invención, un compuesto que regula positivamente (es decir, reduce) el nivel o la actividad (es decir, la función) de DLL3 que se encuentra incrementada en el suero o tejido de sujetos que presentan una o más de las enfermedades de la invención. Entre los ejemplos de dicho compuesto se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, oligonucleótidos antisentido de DLL3, ribozimas, anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) dirigidos contra DLL3 y compuestos que inhiben la actividad enzimática de DLL3. Otros compuestos útiles, p.ej., antagonistas de DLL3 y antagonistas de DLL3 de molécula pequeña, pueden identificarse utilizando ensayos *in vitro*.

El cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, también pueden tratarse o prevenirse mediante la administración en un sujeto que se sospecha que presenta o que es conocido que presenta dicho cáncer, o que está en riesgo de desarrollar dicho cáncer, de un compuesto que regula negativamente el nivel o la actividad (es decir, la función) de DLL3 que se encuentra incrementada en el suero o tejido de sujetos que presentan dicho cáncer. Entre los ejemplos de dicho compuesto se incluyen, aunque sin limitarse a ellos: DLL3, fragmentos de DLL3 y polipéptidos relacionados con DLL3; ácidos nucleicos codificantes de DLL3, un fragmento de DLL3 y un polipéptido relacionado con DLL3 (p.ej., para la utilización en terapia génica) y, para aquellos DLL3 o polipéptidos relacionados con DLL3 con actividad enzimática, compuestos o moléculas que es conocido que modulan dicha actividad enzimática. Otros compuestos que pueden utilizarse, p.ej., agonistas de DLL3, pueden identificarse utilizando ensayos *in vitro*.

En otra realización, la terapia o la profilaxis se personaliza a las necesidades del sujeto individual. De esta manera, en realizaciones específicas, los compuestos que estimulan el nivel o función de DLL3 se administran terapéutica o profilácticamente en un sujeto que se sospecha que presenta, o que es conocido que presenta, cáncer, p.ej., enfermedades de la invención, en el que los niveles o funciones de DLL3 son nulos o reducidos respecto a un control o intervalo de referencia normal. En realizaciones adicionales, los compuestos que estimulan el nivel o función de DLL3 se administran terapéutica o profilácticamente en un sujeto que se sospecha que presenta, o que es conocido que presenta, cáncer, p.ej., enfermedades de la invención en el que los niveles o funciones de DLL3 o incrementada respecto a un control o intervalo de referencia normal. En realizaciones adicionales, los compuestos que reducen el nivel o función de DLL3 se administran terapéutica o profilácticamente en un sujeto que se sospecha que presenta, o que es conocido que presenta, cáncer, p.ej., enfermedades de la invención en el que los niveles o funciones de DLL3 son reducidos en comparación con un control o intervalo de referencia normal. El cambio en la función o nivel de DLL3 debido a la administración de dichos compuestos puede detectarse fácilmente, p.ej., obteniendo una muestra (p.ej., sangre u orina) y analizando *in vitro* los niveles o actividades de DLL3 o los niveles de ARNm codificantes de DLL3, o cualquier combinación de los anteriores. Dichos ensayos pueden llevarse a cabo antes y después de la administración del compuesto tal como se indica en la presente memoria.

Entre los compuestos indicados en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cualquier compuesto,

p.ej., una molécula orgánica pequeña, péptido, anticuerpo (u otro reactivo de afinidad), ácido nucleico, etc., que restaura el perfil de DLL3 hacia la normalidad. En un aspecto, el compuesto de la invención es un anticuerpo biespecífico según se caracteriza mediante las reivindicaciones adjuntas. Los compuestos de la invención pueden administrarse en combinación con cualesquiera otros fármacos quimioterapéuticos.

Terapia de vacuna

Otro aspecto indicado en la presente memoria es una composición inmunogénica, convenientemente una composición de vacuna, que comprende DLL3 o un fragmento que contiene epítomos del mismo, o un ácido nucleico codificante de DLL3 o un fragmento del mismo, opcionalmente junto con un inmunoestimulante.

Se proporciona además un método para elevar una respuesta inmunitaria, que comprende administrar en un sujeto dichas composiciones y un método para tratar o prevenir el cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, que comprende administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de dichas composiciones, y dichas composiciones para la utilización en la prevención o el tratamiento de las enfermedades de la invención.

De esta manera, DLL3 puede resultar útil como material antigénico y puede utilizarse en la producción de vacunas para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, p.ej., de las enfermedades de la invención. Dicho material puede ser "antigénico" y/o "inmunogénico". Generalmente, se considera que "antigénico" se refiere a que la proteína es capaz de utilizarse para generar anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) o, en efecto, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en un sujeto o animal experimental. El término "inmunogénico" se considera que se refiere a que la proteína es capaz de inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria protectora, en un sujeto o animal experimental. De esta manera, en el último caso, la proteína puede ser capaz de no sólo generar una respuesta de anticuerpos sino, además, respuestas inmunitarias no basadas en anticuerpos. El término "inmunogénico" comprende además si la proteína puede inducir una respuesta de tipo inmunitario en un contexto *in vitro*, p.ej., un ensayo de proliferación de células T. La generación de una respuesta inmunitaria apropiada puede requerir uno o más adyuvantes y/o una presentación apropiada de un antígeno.

El experto en la materia apreciará que homólogos o derivados de DLL3 también encontrarán utilidad como material antigénico/inmunogénico. De esta manera, por ejemplo proteínas que incluyen una o más adiciones, deleciones, sustituciones o similares, se encuentran comprendidas en la presente exposición. Además, puede resultar posible sustituir un aminoácido por otro de "tipo" similar, por ejemplo sustituyendo un aminoácido hidrofóbico por otro. Puede utilizarse un programa, tal como el programa CLUSTAL, para comparar las secuencias de aminoácidos. Dicho programa comparar las secuencias de aminoácidos y encuentra la alineación óptima mediante inserción de espacios en cualquiera de las secuencias, según resulte apropiado. Resulta posible calcular la identidad de aminoácidos o la similitud (identidad más conservación de tipo de aminoácido) para una alineación óptima. Un programa como BLASTx alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor al ajuste. De esta manera, resultará posible obtener una comparación en la que se encuentran varias regiones de similitud, cada una con una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis se encuentran contemplados en la presente invención.

En el caso de homólogos y derivados, el grado de identidad con una proteína tal como se indica en la presente memoria resulta menos importante que el hecho de que el homólogo o derivado debería conservar su antigenicidad y/o inmunogenicidad. Sin embargo, convenientemente, se proporcionan homólogos o derivados que presentan una similitud de por lo menos 60% (tal como se ha comentado anteriormente) respecto a las proteínas o polipéptidos indicados en la presente memoria, por ejemplo se proporcionan homólogos o derivados que presentan una similitud de por lo menos 70%, tal como una similitud de por lo menos 80%. Particularmente, se proporciona homólogos o derivados que presentan una similitud de por lo menos 90% o incluso de 95%. Convenientemente, los homólogos o derivados presentan una identidad de secuencia de por lo menos 60% respecto a las proteínas o polipéptidos indicados en la presente memoria. Preferentemente, los homólogos o derivados presentan una identidad de por lo menos 70%, más preferentemente de por lo menos 80%. Más preferentemente, los homólogos o derivados presentan una identidad de por lo menos 90% o incluso de 95%.

En un enfoque alternativo, los homólogos o derivados podrían ser proteínas de fusión, que incorporan fracciones que facilitan la purificación, por ejemplo etiquetando eficazmente la proteína o polipéptido deseado. Puede resultar necesario eliminar la "etiqueta" o puede ocurrir que la proteína de fusión misma conserve suficiente antigenicidad para resultar útil.

Es bien conocido que resulta posible cribar una proteína o polipéptido antigénico a fin de identificar regiones epitópicas, es decir, aquellas regiones que son responsables de la antigenicidad o inmunogenicidad de la proteína o polipéptido. Pueden utilizarse métodos bien conocidos por el experto en la materia para someter a ensayo fragmentos y/o homólogos y/o derivados para antigenicidad. De esta manera, los fragmentos indicados en la presente memoria deberían incluir una o más de dichas regiones epitópicas o ser suficientemente similar a dichas regiones para conservar sus propiedades antigénicas/inmunogénicas. De esta manera, para los fragmentos indicados en la presente memoria, el grado de identidad tal vez es irrelevante, debido a que puede resultar 100% idéntica a una parte particular de una proteína o polipéptido, homólogo o derivado tal como se indica en la presente memoria. La cuestión clave,

nuevamente, es que el fragmento conserve las propiedades antigénicas/inmunogénicas de la proteína a partir de la que se deriva.

Lo que resulta importante para homólogos, derivados y fragmentos es que posean por lo menos un grado de antigenicidad/inmunogenicidad de la proteína o polipéptido a partir del cual se derivan. De esta manera, en un aspecto adicional, se proporcionan fragmentos antigénicos y/o inmunogénicos de DLL3 o de homólogos o derivados del mismo.

DLL3, o fragmentos antigénicos del mismo, puede proporcionarse solo, en forma de una preparación purificada o aislada. Pueden proporcionarse como parte de una mezcla con otra u otras proteínas, o fragmentos antigénicos de las mismas. En un aspecto adicional, por lo tanto, en la presente memoria se proporciona una composición antigénica que comprende DLL3 y/o uno o más fragmentos antigénicos del mismo. Dicha composición puede utilizarse para la detección y/o el diagnóstico del cáncer, p.ej., de las enfermedades de la invención.

Las composiciones de vacuna indicadas en la presente memoria puede ser una composición de vacuna profiláctica o terapéutica.

Las composiciones de vacuna indicadas en la presente memoria pueden incluir uno o más adyuvantes (inmunoestimulantes). Entre los ejemplos bien conocidos de la técnica se incluyen geles inorgánicos, tales como hidróxido de aluminio y emulsiones de agua-en-aceite, tales como adyuvante incompleto de Freund. Otros adyuvantes útiles resultarán bien conocidos por el experto en la materia.

Entre los adyuvantes adecuados para la utilización en composiciones de vacuna para el tratamiento del cáncer se incluyen: monofosforil-lípido A 3De-O-acilado (conocido como 3D-MPL o simplemente MPL; ver el documento n° WO92/116556); una saponina, por ejemplo QS21 o QS7, y agonistas de TLR4, tales como una molécula que contiene CpG, por ejemplo tal como se da a conocer en el documento n° WO95/26204. Los adyuvantes utilizados pueden ser una combinación de componentes, por ejemplo MPL y QS21, o MPL, QS21 y una fracción que contiene CpG. Pueden formularse adyuvantes en forma de emulsiones de aceite-en-agua o formulaciones liposómicas. Dichas preparaciones pueden incluir otros vehículos.

En otra realización, se utiliza una preparación de oligonucleótidos que comprende 10 o más nucleótidos consecutivos complementarios a una secuencia de nucleótidos codificante de DLL3 o se utiliza un fragmento peptídico de DLL3 como vacunas para el tratamiento del cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención. Dichas preparaciones pueden incluir adyuvantes u otros vehículos.

Inhibición de DLL3 para tratar las enfermedades de la invención

En una realización, el cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, se tratan o se previenen mediante la administración de un compuesto que antagoniza/inhibe el nivel y/o la función de DLL3 que se encuentra elevado en el suero o tejido de sujetos que presentan dicho cáncer, en comparación con el suero o tejido de sujetos libres de dicho cáncer.

Entre los compuestos útiles para dicho propósito se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos anti-DLL3 (u otros reactivos de afinidad, y fragmentos y derivados que contienen la región de unión de los mismos), ácidos nucleicos antisentido de DLL3 o ribozimas, y ácidos nucleicos codificantes de DLL3 disfuncional que pueden utilizarse para "desactivar" la función endógena de DLL3 mediante recombinación homóloga (ver, p.ej., Capecchi, Science 244:1288-1292, 1989). Pueden identificarse otros compuestos que inhiben la función de DLL3 mediante la utilización de ensayos *in vitro* conocidos, p.ej., ensayos para la capacidad de un compuesto de ensayo de inhibir la unión de DLL3 a otra proteína o a una pareja de unión, o de inhibir una función conocida de DLL3.

Dicha inhibición puede someterse a ensayo, por ejemplo, *in vitro* o en cultivo celular, aunque también pueden utilizarse ensayos genéticos. Las Tecnologías preferentes también pueden utilizarse para detectar niveles de DLL3 antes y después de la administración del compuesto. Se utilizan ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados para determinar el efecto de un compuesto específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado, tal como se explica en mayor detalle posteriormente.

En una realización específica, un compuesto que inhibe la función (actividad) de DLL3 se administra terapéutica o profilácticamente en un sujeto en el que se detecta un nivel en suero o tejido o una actividad funcional de DLL3 incrementados (p.ej., mayores que el nivel normal o el nivel deseado) en comparación con el suero o tejido de sujetos con, p.ej., las enfermedades de la invención que no reciben tratamiento según la invención o para llevar el nivel o actividad al observado en sujetos libres de dicho cáncer, o hasta un intervalo de referencia predeterminado. Pueden utilizarse métodos estándares de la técnica para medir el incremento del nivel o función de DLL3, tal como se ha indicado de manera general anteriormente. Entre las composiciones inhibidores de DLL3 adecuadas pueden incluirse, por ejemplo, moléculas pequeñas, es decir, moléculas de 1000 daltons o menos. Dichas moléculas pequeñas pueden identificarse mediante los métodos de cribado indicados en la presente memoria.

Ensayos para compuestos terapéuticos o profilácticos

Se proporcionan adicionalmente en la presente memoria ensayos para la utilización en la identificación de fármacos a fin de identificar o verificar la eficacia de compuestos para el tratamiento o la prevención de cánceres que expresan DLL3, p.ej., las enfermedades de la invención.

De esta manera, se proporciona un método de cribado para compuestos que modulan la actividad de DLL3, comprendiendo el método: (a) poner en contacto DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo, con un compuesto candidato, y (b) determinar si la actividad de DLL3 resulta modulada de esta manera. Dicho procedimiento puede comprender: (a) poner en contacto DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo con un compuesto candidato en una muestra, y (b) comparar la actividad de DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo en dicha muestra después del contacto con dicho compuesto candidato con la actividad de DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo en dicha muestra antes del contacto con dicho compuesto candidato, o con un nivel o actividad de referencia.

El método de cribado puede ser un método de cribado para compuestos que inhiben la actividad de DLL3.

DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo puede expresarse, por ejemplo, sobre o por la célula. DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo puede aislarse, por ejemplo, a partir de células que lo expresan. DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo puede inmovilizarse, por ejemplo, sobre una fase sólida.

Se proporciona además un método de cribado para compuestos que modulan la expresión de DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3, comprendiendo el método: (a) poner en contacto células que expresan DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3 con un compuesto candidato, y (b) determinar si la expresión de DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3 resulta modulada de esta manera. Dicho procedimiento puede comprender: (a) poner en contacto DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3 con un compuesto candidato en una muestra, y (b) comparar la expresión de DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3 por células dicha muestra después del contacto con dicho compuesto candidato con la expresión de DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3 en dicha muestra antes del contacto con dicho compuesto candidato, o con un nivel de referencia de expresión.

El método puede ser un método de cribado para compuestos que inhiben la expresión de DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3.

Entre otros aspectos se incluyen: un compuesto obtenible mediante un método de cribado anteriormente indicado, un compuesto que modula la actividad o expresión de DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3, por ejemplo un compuesto que inhibe la actividad o expresión de DLL3 o ácido nucleico codificante de DLL3.

Dicho compuesto se proporciona para la utilización en el tratamiento o la prevención del cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención. Se proporciona además un método de tratamiento o prevención del cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, que comprende administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto.

Los compuestos de ensayo pueden someterse a ensayo para su capacidad de restaurar los niveles de DLL3 en un sujeto que presenta, p.ej., las enfermedades de la invención hasta niveles observados en sujetos libres de dichos cánceres o para producir cambios similares en modelos animales experimentales de dichos cánceres. Los compuestos capaces de restaurar los niveles de DLL3 en un sujeto que presenta, p.ej., las enfermedades de la invención, hasta niveles observados en sujetos libres de dichos cánceres o para producir cambios similares en modelos animales experimentales de dichos cánceres, pueden utilizarse como compuestos de cabeza de serie para la identificación de fármacos adicionales, o utilizarse terapéuticamente. La expresión de DLL3 puede someterse a ensayo mediante las Tecnologías preferentes, inmunoensayos, electroforesis en gel seguida de visualización, detección de la actividad de DLL3 o cualquier otro método enseñado en la presente memoria o conocido por el experto en la materia. Dichos ensayos pueden utilizarse para cribar fármacos candidatos, en monitorización clínica o en el desarrollo de fármacos, en los que la abundancia de DLL3 puede servir como marcador sustitutivo para enfermedad clínica.

En diversas realizaciones específicas, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de tipos celulares implicados en un trastorno en el sujeto, a fin de determinar si un compuesto presenta un efecto deseado sobre dichos tipos celulares.

Los compuestos para la utilización en terapia pueden someterse a ensayo en sistemas modelo animales adecuados antes del ensayo en seres humanos, incluyendo, aunque sin limitación, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, etc. Para los ensayos *in vivo*, antes de la administración en seres humanos, puede utilizarse cualquier sistema modelo animal conocido de la técnica. Entre los ejemplos de modelos animales de las enfermedades de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas, tales como NCI-H345; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, tales como A549 y H460; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer pancreático, tales como MIA PaCa-2 en ratones desnudos, Marincola et al., J. Surg. Res. 47(6):520-9, dic. de 1989, o xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de piel, tales como MV3 en ratones desnudos; van Muijen et al., Int. J. Cancer 48(1):85-91; 22 de abril, 1991. Estos pueden utilizarse para someter a ensayo compuestos que modulan los niveles de DLL3, ya que la patología mostrada en dichos modelos es similar a

la de, p.ej., las enfermedades de la invención. También resultará evidente para el experto en la materia que, basándose en la presente exposición, pueden producirse animales transgénicos con mutaciones “de desactivación” del gen o genes codificantes de DLL3. Una mutación “desactivadora” de un gen es una mutación que causa que el gen mutado no se exprese, o se exprese en una forma aberrante o a un nivel bajo, de manera que la actividad asociada al producto génico se encuentra ausente o prácticamente ausente. Preferentemente, el animal transgénico es un mamífero, más preferentemente, el animal transgénico es un ratón.

En una realización, los compuestos de ensayo que modulan la expresión de DLL3 se identifican en animales no humanos (p.ej., ratones, ratas, monos, conejos y cobayas), preferentemente modelos animales no humanos para las enfermedades de la invención que expresan DLL3. Según la presente realización, se administra un compuesto de ensayo o un compuesto de control en los animales y se determina el efecto del compuesto de ensayo sobre la expresión de DLL3. Un compuesto de ensayo que altera la expresión de DLL3 puede identificarse comparando el nivel de DLL3 (o de ARNm codificante del mismo) en un animal o grupo de animales tratado con un compuesto de ensayo con el nivel de DLL3 o de ARNm en un animal o grupo de animales tratado con un compuesto de control. Pueden utilizarse técnicas conocidas por el experto en la materia para determinar los niveles de ARNm y de proteína, por ejemplo la hibridación *in situ*. Los animales pueden sacrificarse o no para someter a ensayo los efectos de un compuesto de ensayo.

En otra realización, se identifican compuestos de ensayo que modulan la actividad de DLL3 o una parte biológicamente activa del mismo, en animales no humanos (p.ej., ratones, ratas, monos, conejos y cobayas), preferentemente en modelos animales no humanos para las enfermedades de la invención que expresan DLL3. Según dicha realización, se administra un compuesto de ensayo o un compuesto de control en los animales y se determina el efecto de un compuesto de ensayo sobre la actividad de DLL3. Un compuesto de ensayo que altera la actividad de DLL3 puede identificarse mediante el ensayo de animales tratados con un compuesto de control y animales tratados con el compuesto de ensayo. La actividad de DLL3 puede someterse a ensayo mediante la detección de la inducción de un segundo mensajero celular de DLL3 (p.ej., Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), detectando la actividad catalítica o enzimática de DLL3 o pareja de unión del mismo, detectando la inducción de un gen informador (p.ej., un elemento regulador que es sensible a DLL3 operablemente ligado a un ácido nucleico codificante de un marcador detectable, tal como luciferasa o proteína fluorescente verde) o detectando una respuesta celular (p.ej., la diferenciación celular o la proliferación celular). Pueden utilizarse técnicas conocidas por el experto en la materia para detectar cambios en la actividad de DLL3 (ver, p.ej., la patente US nº 5.401.639).

En todavía otra realización, se identifican compuestos de ensayo que modulan el nivel o expresión de DLL3 en sujetos humanos que presentan, p.ej., las enfermedades de la invención, preferentemente los que presentan, p.ej., grados severos de las enfermedades de la invención. Según dicha realización, se administra un compuesto de ensayo o un compuesto de control en el sujeto humano, y se determina el efecto de un compuesto de ensayo sobre la expresión de DLL3 mediante el análisis de la expresión de DLL3 o el ARNm codificante del mismo en una muestra biológica (p.ej., suero, plasma u orina). Un compuesto de ensayo que altera la expresión de DLL3 puede identificarse mediante comparación del nivel de DLL3 o ARNm codificante del mismo en un sujeto o grupo de sujetos tratado con un compuesto de control con el nivel en un sujeto o grupo de sujetos tratado con un compuesto de ensayo. Alternativamente, pueden identificarse alteraciones en la expresión de DLL3 mediante la comparación del nivel de DLL3 o ARNm codificante del mismo en un sujeto o grupo de sujetos antes y después de la administración de un compuesto de ensayo. Pueden utilizarse técnicas conocidas por el experto en la materia para obtener la muestra biológica y analizar el ARNm o la expresión de proteína. Por ejemplo, las Tecnologías preferentes indicadas en la presente memoria pueden utilizarse para evaluar cambios en el nivel de DLL3.

En otra realización, se identifican compuestos de ensayo que modulan la actividad de DLL3 en sujetos humanos que presentan, p.ej., las enfermedades de la invención (preferentemente los que presentan, p.ej., grados severos de las enfermedades de la invención). En la presente realización, se administra un compuesto de ensayo o un compuesto de control en el sujeto humano, y se determina el efecto de un compuesto de ensayo sobre la actividad de DLL3. Un compuesto de ensayo que altera la actividad de DLL3 puede identificarse mediante comparación de las muestras biológicas de sujetos tratados con un compuesto de control con el de muestras de sujetos tratados con el compuesto de ensayo. Alternativamente, pueden identificarse alteraciones en la actividad de DLL3 mediante la comparación del nivel de actividad de DLL3 en un sujeto o grupo de sujetos antes y después de la administración de un compuesto de ensayo. La actividad de DLL3 puede evaluarse mediante la detección en una muestra biológica (p.ej., suero, plasma u orina) de la inducción de una ruta de transducción de señales celulares de DLL3 (p.ej., Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), actividad catalítica o enzimática de DLL3 o de una pareja de unión del mismo, o una respuesta celular, por ejemplo la diferenciación celular o la proliferación celular. Pueden utilizarse técnicas conocidas por el experto en la materia para detectar cambios en la inducción de un segundo mensajero de DLL3 o cambios en una respuesta celular. Por ejemplo, puede utilizarse RT-PCR para detectar cambios en la inducción de un segundo mensajero celular.

En otra realización, un compuesto de ensayo que cambia el nivel o de expresión de DLL3 hacia niveles detectados en sujetos de control (p.ej., seres humanos libres de, p.ej., las enfermedades de la invención) se selecciona para ensayos posteriores o la utilización terapéutica. En otra realización, un compuesto de ensayo que cambia la actividad de DLL3 hacia la actividad observada en sujetos de control (p.ej., seres humanos libres de, p.ej., las enfermedades de la invención) se selecciona para ensayos posteriores o la utilización terapéutica.

En otra realización, los compuestos de ensayo que reducen la severidad de uno o más síntomas asociados a, p.ej., las enfermedades de la invención, se identifican en sujetos humanos que presentan, p.ej., las enfermedades de la invención, preferentemente sujetos con, p.ej., grados severos de las enfermedades de la invención. Según la presente realización, se administra en los sujetos un compuesto de ensayo o un compuesto de control, y se determina el efecto de un compuesto de ensayo sobre uno o más síntomas de, p.ej., las enfermedades de la invención. Un compuesto de ensayo que reduce uno o más síntomas puede identificarse mediante la comparación de los sujetos tratados con un compuesto de control y los sujetos tratados con el compuesto de ensayo. Las técnicas conocidas por los médicos a los que resultan familiares, p.ej., las enfermedades de la invención, pueden utilizarse para determinar si un compuesto de ensayo reduce uno o más síntomas asociados a, p.ej., las enfermedades de la invención. Por ejemplo, un compuesto de ensayo que reduce la carga tumoral en un sujeto que presenta, p.ej., las enfermedades de la invención, resultará beneficioso para dicho sujeto.

En otra realización, un compuesto de ensayo que reduzca la severidad de uno o más síntomas asociados a cáncer, p.ej., las enfermedades de la invención, se selecciona para ensayos posteriores o para la utilización terapéutica.

Composiciones terapéuticas y profilácticas y utilización de las mismas

En la presente memoria se proporcionan métodos de tratamiento (y profilaxis) que comprenden administrar en un sujeto una cantidad eficaz de un compuesto (p.ej., proteína DLL3, un reactivo de afinidad capaz de unión específica a DLL3 o un fragmento del mismo, o un ácido nucleico codificante de DLL3). En un aspecto, el compuesto de la invención es un anticuerpo biespecífico según se caracteriza mediante las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto particular, el compuesto se purifica sustancialmente (p.ej., está sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados).

Las formulaciones y métodos de administración que pueden utilizarse en el caso de que el compuesto comprenda un ácido nucleico se han indicado anteriormente; se indican posteriormente formulaciones apropiadas y vías de administración adicionales.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar un compuesto de la invención, p.ej., el encapsulado en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptores (ver, p.ej., Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción pueden ser entéricos o parentales, y entre ellos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (p.ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede resultar deseable introducir las composiciones farmacéuticas en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede verse facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo unida a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. También puede utilizarse la administración pulmonar, p.ej., mediante la utilización de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante.

En un aspecto, un ácido nucleico utilizado tal como se indica en la presente memoria puede administrarse en la dermis, por ejemplo, utilizando la administración epidérmica mediada por partículas.

En una realización específica, puede resultar deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente en la zona en necesidad de tratamiento; lo anterior puede conseguirse, por ejemplo, y no a título limitativo, mediante infusión local durante cirugía; aplicación tópica, p.ej., mediante inyección; mediante catéter, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en, p.ej., tejido de pulmón, páncreas y piel o en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o tejido neoplásico o pre-neoplásico.

En otra realización, el compuesto puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver Langer, Science 249:1527-1533, 1990; Treat et al., en: Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, New York, páginas 353 a 365, 1989; Lopez-Berestein, *ibid.*, páginas 317 a 327; ver generalmente *ibid.*)

En todavía otra realización, el compuesto puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede utilizarse una bomba (ver Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201, 1987; Buchwald et al., Surgery 88:507, 1980; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574, 1989). En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos (ver Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983; ver también Levy et al., Science 228:190, 1985; During et al., Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard et al., J. Neurosurg.

71:105, 1989). En todavía otra realización, un sistema de liberación controlada puede introducirse en proximidad de la diana terapéutica, p.ej., las enfermedades de la invención, requiriendo de esta manera únicamente una fracción de la dosis sistémica (ver, p.ej., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, páginas 115 a 138, 1984). Otros sistemas de liberación controlada se comentan en la revisión de Langer, Science 249:1527-1533, 1990.

En una realización específica en la que el compuesto indicado en la presente memoria es un ácido nucleico codificante de una proteína, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para estimular la expresión de su proteína codificada, mediante la construcción de la misma como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y la administración del mismo de manera que entra en la célula, p.ej., mediante la utilización de un vector retroviral (ver la patente US nº 4.980.286) o mediante inyección directa o mediante la utilización del bombardeo con micropartículas (p.ej., una pistola génica, Biolistic, Dupont) o el recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante la administración del mismo unido a un péptido de tipo homeobox que es conocido que entra en el núcleo (ver, p.ej., Joliet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868, 1991), etc. Alternativamente, puede introducirse un ácido nucleico en la célula e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, mediante recombinación homóloga.

En la presente memoria se proporcionan además composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a adecuado para la aprobación por un organismo de control del gobierno federal o estatal, o listado en la Farmacopea US u otra farmacopea generalmente reconocida para la utilización en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es el portador preferente en el caso de que la composición farmacéutica se administre por vía intravenosa. También pueden utilizarse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Entre los excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Dichas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse en forma de un supositorio, con ligantes tradicionales y portadores, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándares, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin. Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, por ejemplo en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador, de manera que proporcionen la forma para la administración apropiada en el sujeto. La formulación debe ser adecuada al modo de administración.

En una realización, por ejemplo en la que se utilizan uno o más anticuerpos, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa en seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. En caso necesario, la composición puede incluir además un agente solubilizador y un anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se administran por separado o se mezclan entre sí en una forma de dosis unitaria, por ejemplo en forma de unos polvos liofilizados secos o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. En el caso de que la composición se administre mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. En el caso de que la composición se administre mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Los compuestos de la invención pueden formularse en forma de formas neutras o salinas. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen, en caso apropiado, las formadas con grupos amino libres, tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con grupos carboxilo libres, tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaina, etc.

La cantidad del compuesto de la invención que resultará eficaz en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención, puede determinarse mediante técnicas clínicas estándares. Además, los ensayos *in vitro* pueden utilizarse opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que debe utilizarse en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debería decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuados para la administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 20 a 500 microgramos de compuesto activo por cada kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosis adecuados para la administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso

corporal. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivados de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelo animal.

5 Los supositorios generalmente contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10% en peso; las formulaciones orales preferentemente contienen 10% a 95% de ingrediente activo.

10 En la presente memoria se proporciona además un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociados con dicho recipiente o recipientes puede encontrarse un prospecto en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, utilización o comercialización de fármacos o productos biológicos, en el que el prospecto muestra: (a) la autorización por parte del organismo de la fabricación, utilización o comercialización para la administración humana, (b) instrucciones de utilización, o ambos.

15 De esta manera, en un aspecto, el kit comprende anticuerpos utilizados en la invención, por ejemplo los anticuerpos pueden liofilizarse para la reconstitución antes de la administración o utilización. En el caso de que el kit sea para la utilización en terapia/tratamiento, tal como cáncer, el anticuerpo o anticuerpos pueden reconstituirse con una solución acuosa isotónica, que opcionalmente puede proporcionarse con el kit. En un aspecto, el kit puede comprender un polipéptido, tal como un polipéptido inmunogénico utilizado en la invención, que puede, por ejemplo, estar liofilizado. El último kit puede comprender además un adyuvante para reconstituir el polipéptido inmunogénico.

20 La exposición se extiende además a una composición tal como se indica en la presente memoria, por ejemplo una composición farmacéutica y/o una composición de vacuna para la utilización en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto.

25 En una realización todavía adicional, en la presente memoria se proporciona un medicamento que comprende, por separado o juntos:

- (a) un reactivo de afinidad que se une a DLL3, y
- (b) un agente anticáncer u otro agente activo,

30 para la administración simultánea, secuencial o separada en el tratamiento del cáncer, preferentemente en el tratamiento de una de las enfermedades de la invención.

35 Determinación de la abundancia de DLL3 mediante tecnología de obtención de imágenes

Una ventaja de determinar la abundancia de DLL3 mediante tecnología de obtención de imágenes puede ser que dicho método es no invasivo (excepto en el caso de que los reactivos deban administrarse) y no hay necesidad de extraer una muestra del sujeto.

40 Entre las tecnologías de obtención de imágenes adecuadas se incluyen la tomografía de emisión de positrones (PET) y la tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT). La visualización de DLL3 utilizando dichas técnicas requiere la incorporación o unión de un marcaje adecuado, p.ej., un radiotrazador, tal como ^{18}F , ^{11}C o ^{123}I (ver, p.ej., NeuroRx - The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics 2(2), 348-360, 2005 e *idem* páginas 361 a 371 para más información sobre las técnicas). Pueden incorporarse radiotrazadores u otros marcajes en DLL3 mediante la administración en el sujeto (p.ej., mediante inyección) de un ligando específico convenientemente marcado. Alternativamente, pueden incorporarse en un reactivo de afinidad de unión (p.ej., anticuerpo) específico para DLL3 que puede administrarse en el sujeto (p.ej., mediante inyección). Para un comentario de la utilización de anticuerpos para la obtención de imágenes, ver, p.ej., Orlova A, Magnusson M, Eriksson TL, Nilsson M, Larsson B, Hoiden-Guthenberg I, Widstrom C, Carlsson J, Tolmachev V, Stahl S, Nilsson FY, Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding Affibody molecule, Cancer Res. 66(8):4339-48, 15 de abril de 2006).

50 Diagnóstico y tratamiento del cáncer, incluyendo las enfermedades de la invención, utilizando inmunohistoquímica

55 La inmunohistoquímica es una técnica de detección excelente y puede, por lo tanto, resultar muy útil en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, incluyendo las enfermedades de la invención. Puede utilizarse la inmunohistoquímica para detectar, diagnosticar o monitorizar cánceres, tales como los indicados anteriormente, mediante la localización de antígenos DLL3 en secciones de tejido mediante la utilización de anticuerpos marcados (u otros reactivos de afinidad), derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente a DLL3 como reactivos específicos mediante interacciones de antígeno-anticuerpo que se visualizan mediante un marcador, tal como un pigmento fluorescente, enzima, elemento radioactivo u oro coloidal.

60 El avance de la tecnología de anticuerpos monoclonales ha resultado de gran significancia en garantizar un lugar para la inmunohistoquímica en el diagnóstico microscópico preciso moderno de los neoplasmas humanos. La identificación de células transformadas neoplásicamente diseminadas mediante inmunohistoquímica permite obtener una fotografía más clara de la invasión y metástasis del cáncer, así como de la evolución del inmunofenotipo asociado a las células tumorales hacia un carácter más maligno. Los futuros enfoques terapéuticos antineoplásicos pueden incluir una

diversidad de inmunoterapias individualizadas, específicas para el patrón inmunofenotípico particular asociado a la enfermedad neoplásica de cada paciente individual. Para un comentario más extenso, ver, p.ej., Bodey B, The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms, Expert Opin. Biol. Ther. 2(4):371-93, abril de 2002.

La invención se ilustra mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

EJEMPLO 1: identificación de DLL3 expresado en muestras tisulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, de cáncer de pulmón de células pequeñas y de células piel mediante la utilización de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL/EM)

Mediante la utilización del protocolo siguiente, se digirieron proteínas membranales extraídas de tejido de cáncer de pulmón de células no pequeñas, de cáncer de pulmón de células pequeñas, de cáncer pancreático y de cáncer de piel y muestras correspondientes de tejido normal o tejido contiguo normal (NAT) y los péptidos resultantes se secuenciaron mediante espectrometría de masas en tándem.

1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.1 Fraccionamiento de membranas plasmáticas

Las células recuperadas a partir de cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pancreático o cáncer de piel o un tejido normal o contiguo normal se homogeneizaron y se sometieron a centrifugación a 1000 x g. Se extrajo el sobrenadante y se ultracentrifugó a 49500 x g. El pellet resultante se homogeneizó nuevamente y se separó mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Tras la ultracentrifugación a 107000 x g, se recuperaron las fracciones en el límite de fases y se peletizaron.

1.1.2 Solubilización de membranas plasmáticas

Las fracciones de membrana plasmática se resuspendieron en SDS (dodecilsulfato sódico), proporcionando una concentración final de SDS de 0,5%, se centrifugaron y se extrajeron las proteínas solubilizadas.

1.1.3 Tripsinólisis

Para la digestión dentro de la solución, el volumen de una solución de 50 µg de proteína se enrasó a 100 µl utilizando bicarbonato amónico 200 mM. Se añadieron 10 µl del agente reductor DI-ditiotreitol (75 mM) a la muestra y se incubó a 80°C durante 15 minutos. A lo anterior siguió una etapa de bloqueo de cisteínas utilizando 10 µl de yodoacetamida 150 mM y la incubación en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se diluyó la concentración de SDS a 0,05% con la adición de agua ultrapura. Se añadió un volumen suficiente de tripsina (Promega V5111) a la mezcla, considerando 1 µg de tripsina, a 2,75 µg de proteína y se incubó durante la noche a 37°C.

Alternativamente, se redujeron 105 µg de las soluciones de proteína utilizando 3 µl de TCEP 50 mM e incubación a 60°C durante 1 h. A continuación, se procesó la muestra en los dispositivos de filtración FASP del kit de digestión de proteínas (Protein Discovery) siguiendo las instrucciones del fabricante, aunque utilizando bicarbonato de trietilamonio en lugar de bicarbonato amónico. Se llevó a cabo la tripsinólisis en un volumen final de 75 µl utilizando 1 µg de tripsina para 50 µg de proteína.

1.1.4 Fraccionamiento de péptidos

Las muestras de proteína digerida se secaron al vacío, se resuspendieron en solución acuosa al 0,1% de ácido fórmico y se añadió ácido trifluoroacético (TFA) para reducir el pH de la solución a <3. Se separaron los péptidos mediante intercambio iónico utilizando una columna Agilent Zorbax Bio-Strong Cation Exchange series II en un sistema de cromatografía líquida Agilent LC1200 Series. Alternativamente, se utilizó el fraccionador Agilent 3100 OFFGEL y el kit OFFGEL pH 3-10 para la separación basada en el pI, siguiendo el protocolo del proveedor. Tras la rehidratación de las tiras de IPG, se cargaron volúmenes iguales de un digerido de membranas en cada pocillo. Tras la separación, se acidificaron las fracciones resultantes.

1.1.5 Espectrometría de masas

Se analizaron las muestras fraccionadas mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas utilizando un sistema Waters nanoACQUITY UPLC dotado de una columna nanoACQUITY UPLC BEH 130 C18, 75 µm x 250 mm (186003545) y un LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 300 nl/min creciente de 3% a 35% de acetonitrilo durante 120 min. Los espectros de masas de barrido completo se adquirieron a un poder de resolución de 60000 en el intervalo de 400 a 2000 m/z en el Orbitrap. En cada ciclo, se seleccionaron los veinte péptidos más intensos para barridos de CID MS/MS en la trampa de iones lineal con fuente de iones de nanopulverización incorporada en el instrumento.

1.1.6 Análisis de la secuencia de aminoácidos de péptidos

Los datos en bruto generados en el LTQ Orbitrap Velos se procesaron mediante el software Mascot (Matrix Science), que utiliza el algoritmo Mowse (Curr. Biol. 3(6):327-3, 1 de junio de 1993) para inferir las secuencias de aminoácidos a partir de las listas de picos mediante la búsqueda frente a una base de datos de secuencias que consiste en Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html) y SwissProt (<http://www.uniprot.org>) junto con secuencias de proteínas contaminantes. Los criterios para la identificación de los péptidos incluían la digestión con tripsina, hasta 2 sitios de corte faltantes y diversas modificaciones biológicas y químicas (metionina oxidada, modificación de cisteína con MMTS o yodoacetamida y la fosforilación de serina, treonina y tirosina). Los péptidos se clasificaron como 1, con un valor esperado de 0,05% o inferior, una puntuación iónica de 28 o superior al cargarlos en la base de datos OGAP de los presentes inventores, en donde se procesaron en grupos de proteínas.

1.1.7 Discriminación de proteínas asociadas a cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pancreático y cáncer de piel

El procedimiento para identificar DLL3 utilizó las secuencias peptídicas obtenidas experimentalmente mediante espectrometría de masas, tal como se ha indicado anteriormente, de proteínas humanas naturales a fin de identificar y organizar los exones codificantes en la secuencia del genoma humano publicada. Dichas secuencias determinadas experimentalmente indicadas en la Tabla 1 se compararon con la base de datos OGAP®, que se compiló mediante procesamiento e integración de las masas de los péptidos, las firmas de los péptidos, los datos de EST y secuencias genómicas de dominio público, tal como se indica en la solicitud de patente internacional nº WO2009/087462.

Tabla 1. Péptidos específicos de DLL3 identificados mediante CL/EM en las membranas plasmáticas de muestras de tejido de cáncer pulmonar de células no pequeñas, de cáncer pulmonar de células pequeñas, de cáncer pancreático y de cáncer de piel.

SEC ID nº	Péptido identificado
SEC ID nº 5	VCLKPGLSEEAESPICALGAALSAR
SEC ID nº 6	AGAWELR
SEC ID nº 7	CEPPAVGTACTR
SEC ID nº 8	AGCSPEHGFCEQPGECR
SEC ID nº 9	SFECTCPR
SEC ID nº 10	NGGLCLDLGHALR
SEC ID nº 11	CSCALGFGGR

1.1.8 Índice de proteínas

El índice de proteínas es una medida de tanto la prevalencia de la proteína como la abundancia peptídica. El algoritmo considera tanto el número de muestras en el que se ha observado la proteína como el número de péptidos observado vs. péptidos observables en cada muestra. A continuación, el valor resultante se clasifica mediante comparación por pares de muestras normales correspondientes vs muestras de cáncer.

1.2 RESULTADOS

Los presentes experimentos identificaron DLL3 tal como se indica adicionalmente en la presente memoria. Se detectó DLL3 de longitud completa en la membrana plasmática de muestras de tejido de cáncer pulmonar de células no pequeñas, de cáncer pulmonar de células pequeñas, de cáncer pancreático y de cáncer de piel. La Tabla 2 muestra la distribución de la expresión de DLL3 medida mediante el índice de proteínas. La expresión de DLL3 en dichos tejidos de cáncer indica que DLL3 es una diana terapéutica y diagnóstica valiosa en estos cánceres.

Tabla 2. Índice de proteína DLL3 (+++++ = muy elevado; ++++ = elevado; +++ = medio; ++ = bajo; + = muy bajo; - = no observado)

Tejido	Cáncer	Normal
<i>Pulmonar de células no pequeñas</i>	+	-
<i>Páncreas</i>	+	-
<i>Piel</i>	+	-
<i>Pulmonar de células pequeñas</i>	+	-

EJEMPLO 2: especificidad de anticuerpos de DLL3 determinada mediante análisis de citometría de flujo

Se sometió a ensayo la especificidad de anticuerpos policlonales de DLL3 mediante análisis de citometría de flujo, llevada a cabo en líneas celulares expresantes de DLL3.

Materiales y métodos:

Se incubaron anticuerpos anti-DLL3 con las células expresantes de DL3, SHP-77. Las células se lavaron en tampón de FACS (DPBS, FBS al 2%), se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µl del anticuerpo SHP-77 primario diluido (también diluido en tampón de FACS). El complejo de anticuerpo-H322 se incubó sobre hielo durante 60 min y después se lavó dos veces con tampón de FACS tal como se ha indicado anteriormente. El pellet de células-anticuerpos se resuspendió en 100 µl del anticuerpo secundario diluido (también diluido en tampón de FACS) y se incubó sobre hielo durante 60 min sobre hielo. El pellet se lavó tal como anteriormente y se resuspendió en 200 µl de tampón de FACS. Las muestras se cargaron en el citómetro de flujo BD FACScanto II y los datos se analizaron utilizando el software de BD FACSDiva.

Resultados

Los resultados del análisis de citometría de flujo demuestran que los anticuerpos policlonales anti-SHP-77 se unen eficazmente a DLL3 humano de superficie celular. Los resultados indican una unión fuerte de dichos anticuerpos contra DLL3 sobre las células SHP-77.

EJEMPLO 3: internalización de anticuerpo policlonales anti-DLL3 por células SHP-77 y N82

Se demostró que los anticuerpos policlonales anti-DLL3 eran internalizados por SHP-77 (cáncer pulmonar de células pequeñas humano) y N82 tras la unión a las células utilizando ensayos PabZAP. Los anticuerpos de PabZAP se unieron a los anticuerpos primarios. A continuación, el complejo de PabZAP fue internalizado por las células. La entrada de saporina en las células resultó en la inhibición de la síntesis de proteínas y finalmente en la muerte celular.

El ensayo de PabZAP se llevó a cabo de la manera siguiente. Se sembró cada una de las células a una densidad de 5×10^3 células en cada pocillo. Los anticuerpos policlonales anti-DLL3 o una IgG humana de control de isotipo se diluyeron en serie y después se añadieron a las células. A continuación, se añadió el PabZAP a una concentración de 50 µg/ml y se dejaron las placas bajo incubación durante 48 y 72 horas. Se detectó la viabilidad celular en las placas mediante el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, G7571) y las placas se leyeron a 490 nm con un luminómetro (Tuner BioSystems, Sunnyvale, CA). Los datos se analizaron con Prism (Graphpad). La muerte celular era proporcional a la concentración de anticuerpos policlonales anti-DLL3.

Los resultados muestran que los anticuerpos policlonales anti-DLL3 resultaron eficientemente internalizados por SHP77 (figura 1a) y N82 (figura 1b), en comparación con el anticuerpo de control de isotipo anti-IgG humano. Los resultados muestran además que los anticuerpos policlonales anti-DLL3 indujeron una eliminación celular de aproximadamente 40% a 1 nmol/l en SHP77 y una eliminación celular de 25% a 100 nmoles/l en N82.

EJEMPLO 4: activación de las células T y lisis específica de las células expresantes de DLL3

Antecedentes:

a fin de evaluar la posibilidad de una diana susceptible de aplicación de un enfoque de BiTE (fragmento de anticuerpo biespecífico que combina epítipo de unión anti-CD3 con un sitio de unión para un antígeno específico en una célula o tejido diana), se desarrolló un ensayo para someter a ensayo la activación de las células T con anti-CD3 y un anticuerpo policlonal específico para un antígeno diana de interés.

Métodos:

para este ensayo, la diana DLL3 se expresó sobre células DMS79. Las células se pintaron con kits de conector celular fluorescente rojo SIGMA PKH26 para el marcaje de membranas celulares general número de catálogo PKH26GL, mediante la dilución de 15 µl de pigmento en 0,5 ml de tampón C (proporcionado en el kit). Se contaron las células DMS79, se centrifugaron a 800 x g, se resuspendieron en medio libre de suero a razón de 10 millones de células en 0,5 ml. Los 0,5 ml de tampón C que contenía 15 µl de pigmento FKH26 se añadieron a las células, se mezclaron suavemente y se incubaron durante 1 a 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió medio más FBS para desactivar el pigmento. Las células se centrifugaron tal como anteriormente, se resuspendieron en medio de ensayo (RPMI más 10% de FBS ultrabajo en IgG - Invitrogen, nº de catálogo 16250078), se centrifugaron una vez más y se resuspendieron en medio de ensayo a razón de 200.000 células por ml. Se añadieron 10.000 células (50 µl) a cada pocillo apropiado de una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. La placa se había recubierto previamente durante la noche con anticuerpo de cabra anti-kappa de ratón de Southern Biotech (nº de catálogo 1050-01) a razón de 3 µg/ml en PBS. El exceso de solución de anticuerpo se eliminó de las placas antes de añadirlo a las células DMS79. Se adquirieron células T CD8⁺ humanas (congeladas) de AllCells, número de catálogo PB009-3F. Las células T se descongelaron y se lavaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se resuspendieron a razón de 1.500.000 células por ml en medio de ensayo. Las células T se añadieron a las células DMS79 en la placa recubierta con anti-kappa de 96 pocillos a razón de 150.000 células en cada pocillo. Se añadió cada uno de los anticuerpos de DLL3 a los pocillos apropiados a concentraciones de 18 µg/ml, 6 µg/ml o 2 µg/ml. Se añadió clon OKT3 anti-CD3 de grado funcional (eBioscience, número de catálogo 16-0037-85) a los pocillos apropiados a concentraciones de 9 µg/ml,

3 µg/ml o 1 µg/ml. Los pocillos de control no recibieron anticuerpo. La placa se incubó durante dos días en un incubador de cultivo tisular humidificado con 5% de CO₂ a 37 grados.

La placa se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos; las células se lavaron en tampón de FACS (PBS + FBS al 5%) y se centrifugaron nuevamente a 400 x g durante cinco minutos. Las células se resuspendieron nuevamente en tampón de FACS y se centrifugaron a 400 x g. Las células se resuspendieron a razón de 200 µl por pocillo de tampón de FACS. Los pocillos se mezclaron suavemente y se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo Guava EasyCyte. Las células pintadas FKH26 rojas se analizaron en el canal del amarillo. Se adquirió el mismo número de células totales para cada pocillo y las células en el amarillo (canal de células pintadas FKH26) se contaron y se calculó el porcentaje de citotoxicidad respecto a las células T de los pocillos de control más células DMS79 sin anticuerpo anticonejo, anti-CD3 o policlonal de DLL3 (el recuento celular medio era el mismo +/- anticuerpo anti-kappa unido a la placa).

Resultados:

La figura 2 muestra la lisis específica de células DMS79 por anticuerpo policlones anti-DLL3 y que la muerte celular era proporcional a la concentración de anticuerpo. De esta manera, los anticuerpos policlones anti-DLL3 fueron capaces de inducir citotoxicidad de las células T mediante activación por CD3.

EJEMPLO 5: Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo contra DLL3

Utilizando el Protocolo de referencia siguiente, se llevó a cabo inmunohistoquímica en tejidos de tumor pulmonar FFPE y normales utilizando un anticuerpo policlonal de DLL3.

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 Materiales

Citroclear (HC5005) de TCS Biosciences, Reino Unido.
 Reactivo alcohol (R8382) de Sigma-Aldrich, Reino Unido.
 Solución de recuperación de diana, pH 6 (S2369) de Dako, Reino Unido.
 Solución de bloqueo de peroxidasa REAL (S2023) de Dako, Reino Unido.
 Diluyente de anticuerpo (S0809) de Dako, Reino Unido.
 Polímero EnVision+ conjugado con HRP, de ratón (K4000) de Dako, Reino Unido.
 Sustrato líquido DAB+ (K3468) de Dako, Reino Unido.
 Hematoxilina de Mayer (X0909) de Dako, Reino Unido.
 Aquatex (1.08562.0050) de VWR, Reino Unido.
 Las secciones y matrices de tejidos eran de US Biomax Inc., MD, EE.UU.

5.1.2 Desparafinado y rehidratación

Los portaobjetos se desparafinaron en Citroclear (2x5 minutos) y después se rehidrataron con alcohol al 100% (2x5 minutos), alcohol al 50% (1x5 minutos) y agua corriente (1x5 minutos).

5.1.3 Recuperación de antígenos (olla a presión)

El antígeno DLL3 se recuperó bajo presión durante 20 minutos en 50 ml de solución de recuperación de diana en una jarra de Coplin. A continuación, los portaobjetos se dejaron enfriar hasta la temperatura ambiente durante 20 min adicionales. Se dibujó el contorno de cada sección de tejido/TMA con un lápiz de barrera hidrofóbica y los portaobjetos a continuación se lavaron dos veces en PBS, 3 minutos cada lavado.

5.1.4 Tinción de tejidos

La actividad endógena de peroxidasa se bloqueó mediante incubación de los tejidos con solución de bloqueo de peroxidasa durante 10 minutos a TA en una cámara humidificada. A continuación, los portaobjetos se lavaron una vez en PBS y una vez en PBS-T (PBS que contiene Tween-20, al 0,125% v/v), 3 minutos cada lavado. Se aplicó anticuerpo primario (diluido 1/160 en diluyente de anticuerpo) a cada sección de tejido y/o micromatriz, y los portaobjetos se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente en una cámara humidificada. A continuación, los portaobjetos se lavaron una vez en PBS y una vez en PBS-T, 3 minutos cada lavado. Seguidamente se aplicó el polímero EnVision+ conjugado con HRP a los tejidos y los portaobjetos se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una cámara humidificada. A continuación, los portaobjetos se lavaron una vez en PBS y una vez en PBS-T, 3 minutos cada lavado. Los tejidos se incubaron en sustrato de líquido DAB+ a temperatura ambiente durante 10 min en una cámara humidificada. A continuación, los portaobjetos se lavaron una vez en PBS y una vez en PBS-T; se contratiñeron con hematoxilina durante 1 min a temperatura ambiente en una cámara humidificada y se lavaron nuevamente, una vez en PBS y una vez en PBS-T, 3 minutos cada lavado. Seguidamente, los cubres se montaron sobre los portaobjetos utilizando Aquatex.

5.2 RESULTADOS

5 Los anticuerpos policlonales anti-DLL3 mostraron positividad en las muestras de pulmón FFPE, en las que 60% de las secciones mostraron una tinción robusta (2+/3+).

Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 podrían presentar utilidad como terapéuticos y diagnósticos en algunos de los cánceres sometidos a ensayo y posiblemente otros tipos de cáncer que muestran expresión de DLL3.

10 SECUENCIAS

[illegible]

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <120> DIANA TERAPÉUTICA Y DIAGNÓSTICA

10 <170> PatentIn versión 3.5

15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 813 360 T3

<400> 1

```

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

Ala Leu Ile Phe Leu Pro Gln Thr Arg Pro Ala Gly Val Phe Glu Leu
20        25        30

Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro Arg Ser
35        40        45

Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu Phe Phe Arg Val Cys Leu
50        55        60

Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys Ala Leu Gly
65        70        75        80

Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr Thr Glu Gln Pro Gly Ala
85        90        95

Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly Leu Leu Gln Val Pro Phe
100       105       110

Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe Ile Ile Glu Thr Trp Arg
115       120       125

Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro Ala Trp Ser Leu Leu Ala
130       135       140

Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Arg
145       150       155       160

Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg Phe Ser Tyr Arg Ala
165       170       175

Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg Leu Cys Arg
180       185       190

```

ES 2 813 360 T3

Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Cys Ala
 195 200 205
 Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu Val Cys Arg Ala Gly Cys
 210 215 220
 Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys Arg Cys Leu
 225 230 235 240
 Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val Pro Val Ser Thr Ser Ser
 245 250 255
 Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala Thr Thr Gly Cys Leu Val
 260 265 270
 Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Ser
 275 280 285
 Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg Gly Phe
 290 295 300
 Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Cys Ala Asp Gly Pro
 305 310 315 320
 Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ala
 325 330 335
 Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Asn Cys Glu Lys
 340 345 350
 Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Leu Cys
 355 360 365
 Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg Cys Arg Ala Gly Phe Ala
 370 375 380
 Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp Cys Ala Gly Arg Ala Cys
 385 390 395 400
 Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly Gly Ala His Arg Cys Ser
 405 410 415
 Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys Arg Glu Arg Ala Asp Pro
 420 425 430
 Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly Arg Cys Tyr Ala His Phe
 435 440 445

ES 2 813 360 T3

Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Met Gly Ala Arg Cys
450 455 460

Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser Ala Leu Pro Ala Ala Pro
465 470 475 480

Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Leu Pro Pro Ala
485 490 495

Leu Gly Leu Leu Val Ala Ala Gly Val Ala Gly Ala Ala Leu Leu Leu
500 505 510

Val His Val Arg Arg Arg Gly His Ser Gln Asp Ala Gly Ser Arg Leu
515 520 525

Leu Ala Gly Thr Pro Glu Pro Ser Val His Ala Leu Pro Asp Ala Leu
530 535 540

Asn Asn Leu Arg Thr Gln Glu Gly Ser Gly Asp Gly Pro Ser Ser Ser
545 550 555 560

Val Asp Trp Asn Arg Pro Glu Asp Val Asp Pro Gln Gly Ile Tyr Val
565 570 575

Ile Ser Ala Pro Ser Ile Tyr Ala Arg Glu Val Ala Thr Pro Leu Phe
580 585 590

Pro Pro Leu His Thr Gly Arg Ala Gly Gln Arg Gln His Leu Leu Phe
595 600 605

Pro Tyr Pro Ser Ser Ile Leu Ser Val Lys
610 615

<210> 2
<211> 587
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Val Ser Pro Arg Met Ser Gly Leu Leu Ser Gln Thr Val Ile Leu
1 5 10 15

Ala Leu Ile Phe Leu Pro Gln Thr Arg Pro Ala Gly Val Phe Glu Leu
20 25 30

Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro Arg Ser
35 40 45

Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu Phe Phe Arg Val Cys Leu

ES 2 813 360 T3

50	55	60
Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys Ala Leu Gly 65 70 75 80		
Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr Thr Glu Gln Pro Gly Ala 85 90 95		
Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly Leu Leu Gln Val Pro Phe 100 105 110		
Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe Ile Ile Glu Thr Trp Arg 115 120 125		
Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro Ala Trp Ser Leu Leu Ala 130 135 140		
Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Arg 145 150 155 160		
Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg Phe Ser Tyr Arg Ala 165 170 175		
Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg Leu Cys Arg 180 185 190		
Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Cys Ala 195 200 205		
Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu Val Cys Arg Ala Gly Cys 210 215 220		
Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys Arg Cys Leu 225 230 235 240		
Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val Pro Val Ser Thr Ser Ser 245 250 255		
Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala Thr Thr Gly Cys Leu Val 260 265 270		
Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Ser 275 280 285		
Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg Gly Phe 290 295 300		
Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Cys Ala Asp Gly Pro 305 310 315 320		

ES 2 813 360 T3

Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ala
 325 330 335
 Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Asn Cys Glu Lys
 340 345 350
 Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Leu Cys
 355 360 365
 Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg Cys Arg Ala Gly Phe Ala
 370 375 380
 Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp Cys Ala Gly Arg Ala Cys
 385 390 395 400
 Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly Gly Ala His Arg Cys Ser
 405 410 415
 Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys Arg Glu Arg Ala Asp Pro
 420 425 430
 Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly Arg Cys Tyr Ala His Phe
 435 440 445
 Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Met Gly Ala Arg Cys
 450 455 460
 Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser Ala Leu Pro Ala Ala Pro
 465 470 475 480
 Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Leu Pro Pro Ala
 485 490 495
 Leu Gly Leu Leu Val Ala Ala Gly Val Ala Gly Ala Ala Leu Leu Leu
 500 505 510
 Val His Val Arg Arg Arg Gly His Ser Gln Asp Ala Gly Ser Arg Leu
 515 520 525
 Leu Ala Gly Thr Pro Glu Pro Ser Val His Ala Leu Pro Asp Ala Leu
 530 535 540
 Asn Asn Leu Arg Thr Gln Glu Gly Ser Gly Asp Gly Pro Ser Ser Ser
 545 550 555 560
 Val Asp Trp Asn Arg Pro Glu Asp Val Asp Pro Gln Gly Ile Tyr Val
 565 570 575
 Ile Ser Ala Pro Ser Ile Tyr Ala Arg Glu Ala
 580 585

5
 <210> 3
 <211> 2389
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 813 360 T3

<400> 3
agatataagg cttggaagcc agcagctgcg actcccgaga cccccccacc agaaggccat 60
ggtctcccca cggatgtccg ggctcctctc ccagactgtg atcctagcgc tcattttcct 120
ccccagaca cggcccgcgtg gcgtcttcga gctgcagatc cactctttcg ggccgggtcc 180
aggccctggg gccccgcggt cccctgcag cgcgcggtc ccctgcgcgc tcttcttcag 240
agtctgcctg aagcctgggc tctcagagga ggccgcgag tcccctgctg ccctgggcgc 300
ggcgtgagt gcgcgcggac cggctctacac cgagcagccc ggagcgcccg cgcctgatct 360
cccactgccc gacggcctct tgcagggtgcc cttccgggac gcctggcctg gcaccttctc 420
tttcatcatc gaaacctgga gagaggagtt aggagaccag attggagggc ccgcctggag 480
cctgctggcg cgcgtggctg gcaggcggcg cttggcagcc ggaggcccg gggcccgga 540
cattcagcgc gcagggcctt gggagctgcg cttctcgtac cgcgcgcgct gcgagccgcc 600
tgccgtcggg accgcgtgca cgcgcctctg ccgtccgcgc agcgcacct cgcggtgctg 660
tccgggactg cgcacctgcg caccgctcga ggacgaatgt gagcgccgc tgggtgtgccg 720
agcaggctgc agccctgagc atggcttctg tgaacagccc ggtgaatgcc gatgcctaga 780
gggctggact ggacctctct gcacgggtccc tgtctccacc agcagctgcc tcagccccag 840
gggcccgtcc tctgctacca ccggatgcct tgtccctggg cctgggccct gtgacgggaa 900
cccgtgtgcc aatggaggca gctgtagtga gacaccagg tcctttgaat gcacctgccc 960
gcgtgggttc tacgggctgc ggtgtgaggt gagcgggtg acatgtgcag atggacctg 1020
cttcaacggc ggcttgtgtg tcgggggtgc agacctgac tctgcctaca tctgccactg 1080
cccaccggt ttccaaggct ccaactgtga gaagagggtg gaccggtgca gcctgcagcc 1140
atgccgcaat ggcggactct gcctggacct gggccacgcc ctgcgctgcc gctgccgcgc 1200
cggcttcgcg ggtcctcgct gcgagcacga cctggacgac tgcgcgggcc gcgcctgcgc 1260
taacggcggc acgtgtgtgg agggcgggcg cgcgcaccgc tgctcctgcg cgtgggctt 1320
cggcgggcgc gactgccgcg agcgcgcgga cccgtgcgcc gcgcgcccc gtgctcacgg 1380
cggccgctgc tacgcccact tctccggcct cgtctgcgct tgcgctccc gctacatggg 1440
agcgcggtgt gagttcccag tgacccccga cggcgcaagc gccttgccc cggccccgcc 1500
gggcctcagg cccggggacc ctcagcgcta cttttgcct ccggtctggt gactgctcgt 1560
ggcgcggggc gtggccggcg ctgcgctctt gctggtccac gtgcgcgcc gtggccactc 1620

ES 2 813 360 T3

ccaggatgct ggggtctcgct tgctggctgg gaccccgag ccgtcagtc acgcactccc 1680
 ggatgcactc aacaacctaa ggacgcagga gggttccggg gatggtccga gctcgtccgt 1740
 agattggaat cgccctgaag atgtagacct tcaagggatt tatgtcatat ctgctccttc 1800
 catctacgct cgggaggtag cgacgcccct tttccccccg ctacacactg ggcgcgctgg 1860
 gcagaggcag cacctgcttt ttccctacct ttctctgatt ctgtccgtga aatgaattgg 1920
 gtagagtctc tgggaaggttt taagcccatt ttcagttcta acttactttc atcctatttt 1980
 gcatccctct tatcgttttg agctacctgc catcttctct ttgaaaaacc tatgggcttg 2040
 aggaggtcac gatgccgact ccgccagagc ttttccactg attgtactca gcggggaggc 2100
 aggggaggca gaggggcagc ctctctaatt ctccctactc attttgtttc taggcctgac 2160
 gcgtctcctc catccgcacc tggagtcaga gcgtggattt ttgtatttgc tcggtggtgc 2220
 ccagtctctg cccagaggc tttggagttc aatcttgaag ggggtgtctgg gggaacttta 2280
 ctgttgcaag ttgtaataaa tggttattta taccctattt tttctcacc catctctcta 2340
 gaaacaccta taaaggctat tattgtgatc agttttgact aacaaaaaa 2389

<210> 4
 <211> 2052
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 agatataagg cttggaagcc agcagctgcg actcccgaga cccccccacc agaaggccat 60
 ggtctcccca cggatgtccg ggctcctctc ccagactgtg atcctagcgc tcattttcct 120
 ccccagaca cggcccgtg gcgtcttcga gctgcagatc cactctttcg ggcgggtcc 180
 aggccctggg gcccgcgggt cccctgcag cgcgcggctc ccctgcgcgc tcttcttcag 240
 agtctgcctg aagcctgggc tctcagagga ggccgcgag tcccctgcgc ccctgggcgc 300
 ggcgctgagt gcgcgcggac cgtctacac cgagcagccc ggagcgcccg cgcctgatct 360
 cccactgccc gacggcctct tgcaggtgcc cttccgggac gcctggcctg gcaccttctc 420
 tttcatcatc gaaacctgga gagaggagtt aggagaccag attggagggc ccgcctggag 480
 cctgctggcg cgcgtggctg gcaggcggcg cttggcagcc ggaggcccg ggcccggga 540
 cattcagcgc gcaggcgcct gggagctgcg cttctcgtac cgcgcgcgct gcgagccgcc 600
 tgccgtcggg accgcgtgca cgcgcctctg ccgtccgcgc agcgcgccct cgcggtgcgg 660
 tccgggactg cggccctgcg caccgctcga ggacgaatgt gaggcgcgc tgggtgtccg 720
 agcaggctgc agccctgagc atggcttctg tgaacagccc ggtgaatgcc gatgcctaga 780
 gggctggact ggaccctct gcacgggtccc tgtctccacc agcagctgcc tcagccccag 840
 gggcccgctc tctgctacca ccggatgcct tgtccctggg cctgggccc gtgacgggaa 900
 ccgctgtgcc aatggaggca gctgtagtga gacaccagg tcctttgaat gcacctgcc 960

ES 2 813 360 T3

```

gcgtgggttc tacgggctgc ggtgtgaggt gagcggggtg acatgtgcag atggaccctg 1020
cttcaacggc ggcttgtgtg tcgggggtgc agaccctgac tctgcctaca tctgccactg 1080
ccccccggt ttccaaggct ccaactgtga gaagaggggtg gaccggtgca gcctgcagcc 1140
atgccgcaat ggcggactct gcctggacct gggccacgcc ctgcgctgcc gctgccgcgc 1200
cggcttcgcg ggtcctcgct gcgagcacga cctggacgac tgcgcgggcc gcgcctgcgc 1260
taacggcggc acgtgtgtgg agggcgggcg cgcgccacgc tgctcctgcg cgctgggctt 1320
cggcgggccgc gactgccgcg agcgcgcgga cccgtgcgcc gcgcgcccct gtgctcacgg 1380
cggccgctgc tacgcccact tctccggcct cgtctgcgct tgcgctcccg gctacatggg 1440
agcgcgggtgt gagttcccag tgcaaccgca cggcgcaagc gccttgcccg cggccccgcc 1500
gggcctcagg ccgggggacc ctacagcgta ccttttgccct ccggctctgg gactgctcgt 1560
ggccgcgggc gtggccggcg ctgcgctctt gctgggtccac gtgcgcgcgc gtggccactc 1620
ccaggatgct ggggtctcgt tgctggctgg gaccccgag ccgtcagtcc acgcactccc 1680
ggatgcactc aacaacctaa ggacgcagga gggttccggg gatggtccga gctcgtccgt 1740
agattggaat cggcctgaag atgtagacct tcaagggatt tatgtcatat ctgctccttc 1800
catctacgct cgggaggcct gacgcgtctc tccatccgc acctggagtc agagcgtgga 1860
tttttgtatt tgctcgggtg tgcccagctc ctgcccaga ggctttggag ttcaatcttg 1920
aaggggtgtc tgggggaact ttactgttgc aagttgtaaa taatggttat ttatatccta 1980
ttttttctca ccccatctct ctagaaacac ctataaaggc tattattgtg atcagttttg 2040
actaacaaaa aa 2052

```

```

5 <210> 5
  <211> 25
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens

  <400> 5
  Val Cys Leu Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys
  1 5 10 15

10 Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ser Ala Arg
   20 25

15 <210> 6
  <211> 7
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens

  <400> 6
  Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg
  1 5

20 <210> 7
  <211> 12
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens

25 <400> 7
  Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg
  1 5 10

```

ES 2 813 360 T3

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 8
 Ala Gly Cys Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys
 1 5 10 15
 Arg
 10
 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg
 15 1 5
 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 10
 Asn Gly Gly Leu Cys Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg
 1 5 10
 25
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 11
 Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg
 1 5 10
 35
 <210> 12
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 813 360 T3

<400> 12

Ala Gly Val Phe Glu Leu Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly
1 5 10 15

Pro Gly Ala Pro Arg Ser Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu
20 25 30

Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu
35 40 45

Ser Pro Cys Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr
50 55 60

Thr Glu Gln Pro Gly Ala Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly
65 70 75 80

Leu Leu Gln Val Pro Phe Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Ile Ile Glu Thr Trp Arg Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro
100 105 110

Ala Trp Ser Leu Leu Ala Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala
115 120 125

Gly Gly Pro Trp Ala Arg Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu
130 135 140

Arg Phe Ser Tyr Arg Ala Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala
145 150 155 160

Cys Thr Arg Leu Cys Arg Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro
165 170 175

Gly Leu Arg Pro Cys Ala Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu
180 185 190

Val	Cys	Arg	Ala	Gly	Cys	Ser	Pro	Glu	His	Gly	Phe	Cys	Glu	Gln	Pro
			195				200					205			

Gly Glu Cys Arg Cys Leu Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val
210 215 220

Pro Val Ser Thr Ser Ser Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala
225 230 235 240

Thr Thr Gly Cys Leu Val Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro
245 250 255

ES 2 813 360 T3

Cys Ala Asn Gly Gly Ser Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys
260 265 270

Thr Cys Pro Arg Gly Phe Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val
275 280 285

Thr Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly
290 295 300

Ala Asp Pro Asp Ser Ala Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln
305 310 315 320

Gly Ser Asn Cys Glu Lys Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys
325 330 335

Arg Asn Gly Gly Leu Cys Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg
340 345 350

Cys Arg Ala Gly Phe Ala Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp
355 360 365

Cys Ala Gly Arg Ala Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly
370 375 380

Gly Ala His Arg Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys
385 390 395 400

Arg Glu Arg Ala Asp Pro Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly
405 410 415

Arg Cys Tyr Ala His Phe Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly
420 425 430

Tyr Met Gly Ala Arg Cys Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser
435 440 445

Ala Leu Pro Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg
450 455 460

Tyr Leu
465

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo biespecífico para la utilización en el tratamiento o profilaxis de cáncer de pulmón, en el que DLL3 se expresa en dicho cáncer de pulmón y dicho anticuerpo biespecífico se une a DLL3 y a CD3.
2. Anticuerpo biespecífico para la utilización según la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer pulmonar de células pequeñas.
3. Anticuerpo biespecífico para la utilización según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo biespecífico induce apoptosis de las células de cáncer, elimina o reduce el número de células madre de cáncer y/o elimina o reduce el número de células de cáncer circulantes.

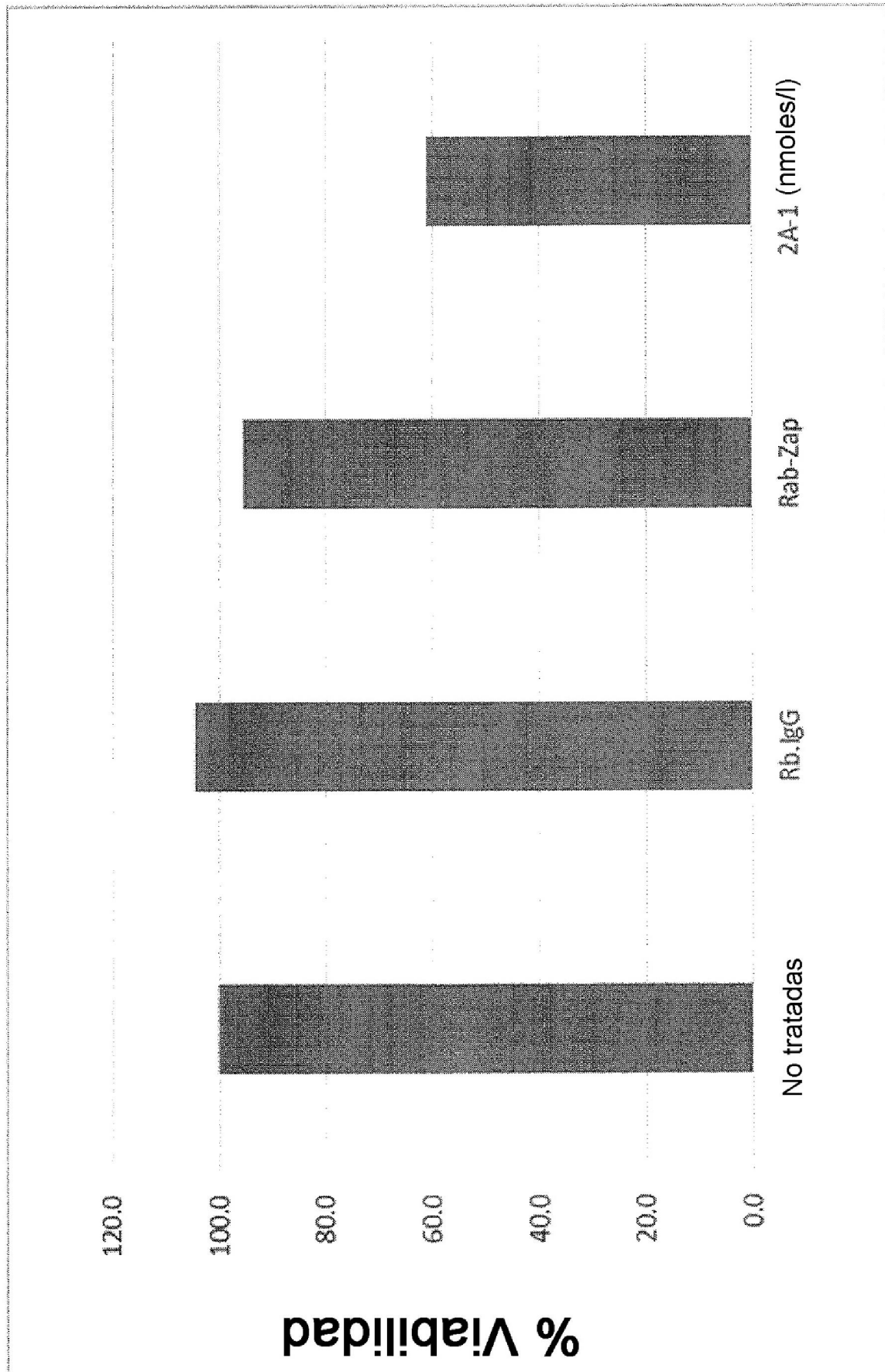


FIGURA 1a

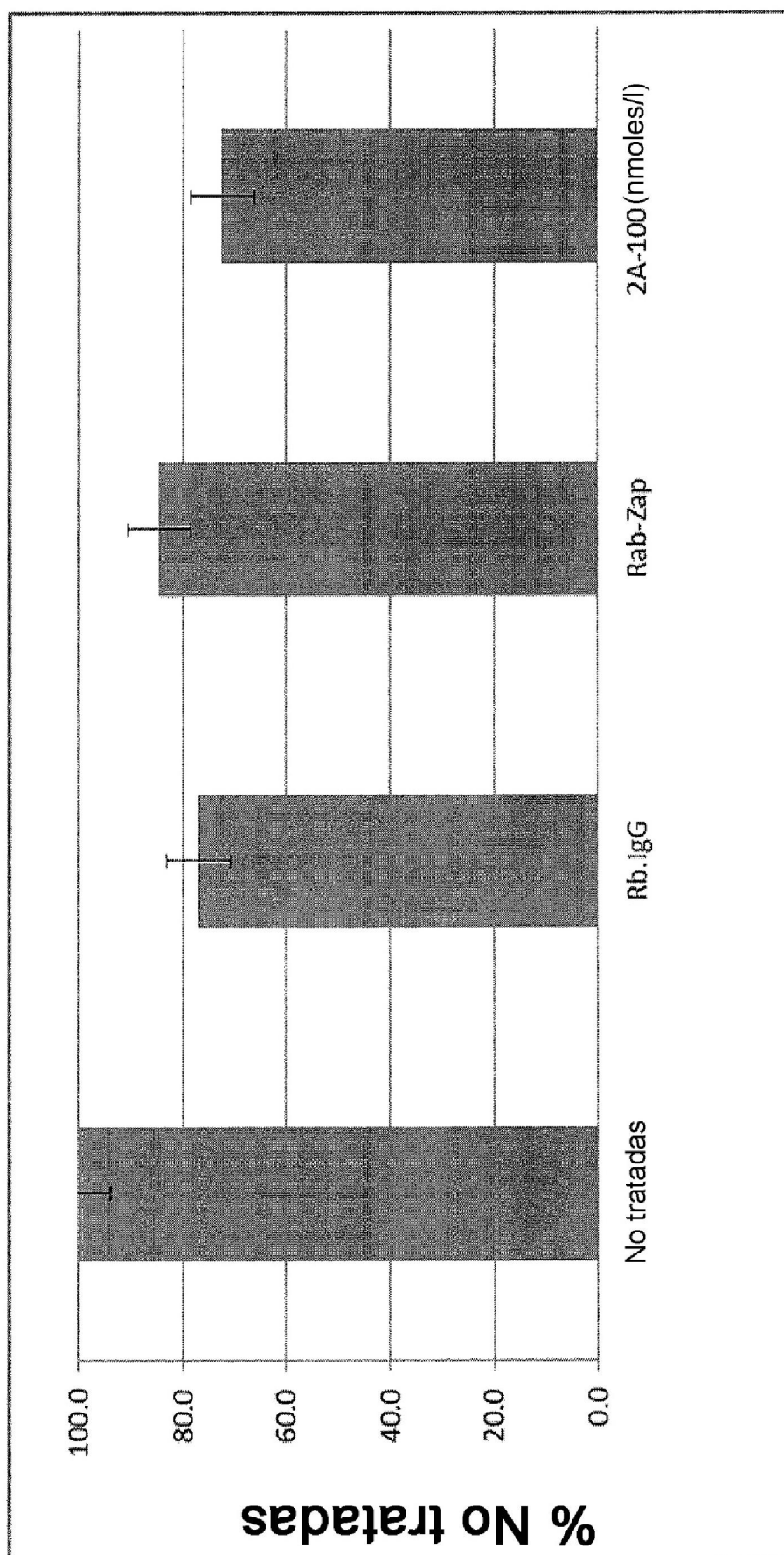


FIGURA 1b

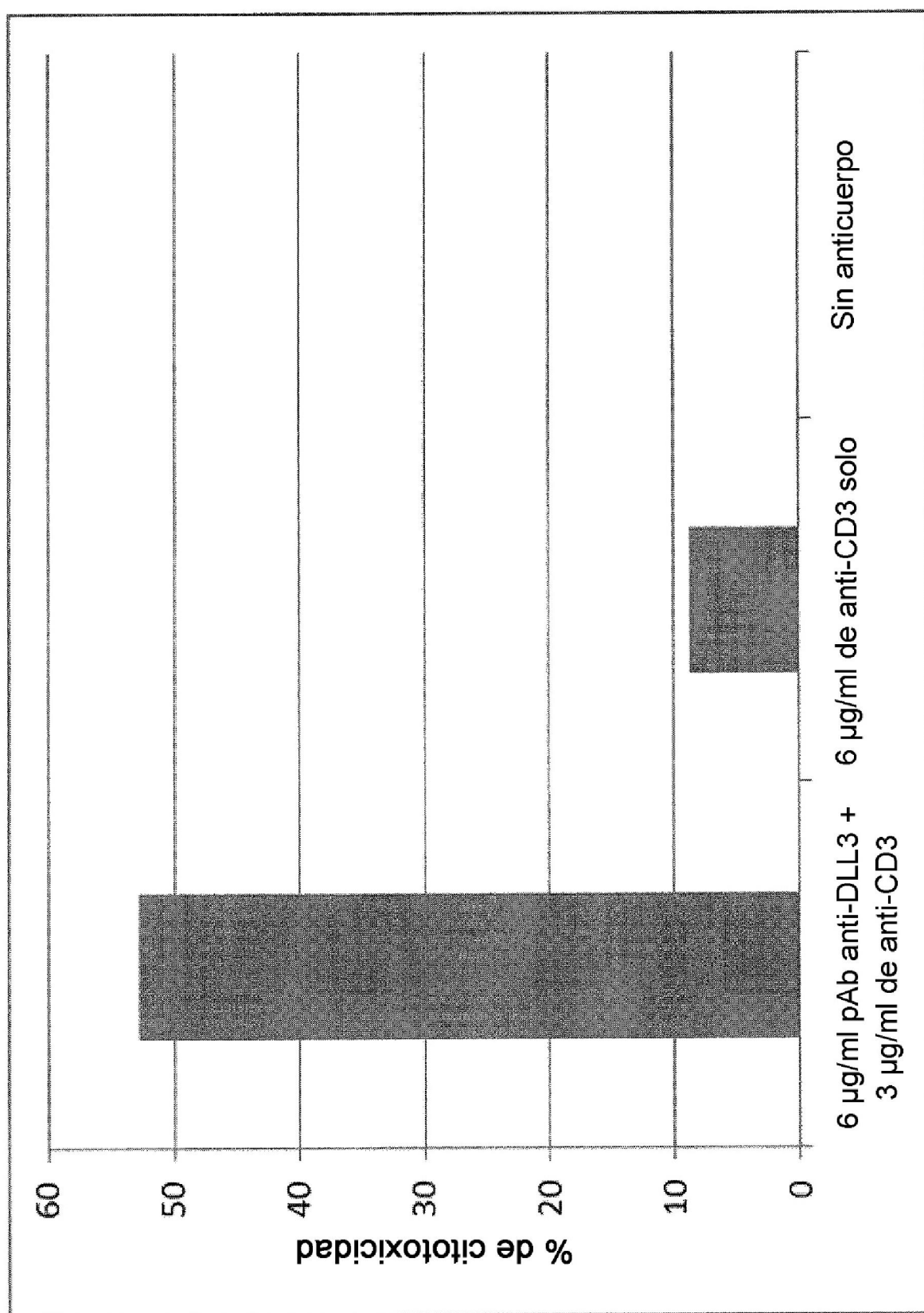


FIGURA 2