

ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA DLL3 Y USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de EE. UU. N°. 62/872.915, presentada el 11 de julio de 2019, cuyo contenido completo se incorpora como referencia en el presente documento.

CAMPO TÉCNICO

La presente tecnología se refiere generalmente a la preparación de composiciones relacionadas con la inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se unen específicamente a la proteína 3 de tipo delta (DLL3), y usos de las mismas. En particular, la presente tecnología se refiere a la preparación de anticuerpos de unión a DLL3 y a su uso para detectar y tratar cánceres asociados a DLL3, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico (CPM), cánceres neuroendocrinos extrapulmonares y carcinoma neuroendocrino macrocítico (CNEM).

DECLARACIÓN DE FINANCIACIÓN GUBERNAMENTAL

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de la CA213448, otorgada por los National Institutes of Health. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

ANTECEDENTES

La siguiente descripción de los antecedentes de la presente tecnología se ofrece meramente como una ayuda en la comprensión de la presente tecnología y no se admite que describa o constituya técnica anterior de la presente tecnología.

Los tumores neuroendocrinos del pulmón (TNEP) abarcan una familia heterogénea de neoplasias clasificadas en cuatro variantes histológicas, carcinoides concretamente típicos (CT), carcinoides atípicos (CA), carcinoma neuroendocrino macrocítico (CNEM) y carcinoma de pulmón microcítico (CPM). Los CPM y los CNEM pulmonares son tumores de grado alto y pronóstico malo, con mayor incidencia en fumadores. El CNEM pulmonar presenta un comportamiento biológicamente agresivo, similar al del CPM. Etapa a etapa, las curvas de supervivencia del CNEM pulmonar y del CPM se solapan y, además, la supervivencia es inferior a la de otros CPNM. El pronóstico es malo incluso en pacientes con cáncer de pulmón en etapa I potencialmente resecable con tasas

de supervivencia de 5 años que varían desde 27 % a 67 %. Véase Iyoda A. *et al.*, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138:446-453 (2009).

SUMARIO DE LA PRESENTE TECNOLOGÍA

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o
 5 fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable
 de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) y un dominio variable de cadena
 ligera de inmunoglobulina (V_L), en donde (a) la V_H comprende una secuencia
 CDR1 de V_H , una secuencia CDR2 de V_H y una secuencia CDR3 de
 10 V_H seleccionadas entre el grupo que consiste en la (i) SEQ ID NO: 3, la SEQ ID
 NO: 4 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente; (ii) la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO:
 14 y la SEQ ID NO: 15, respectivamente; (iii) la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO:
 24 y la SEQ ID NO: 25, respectivamente; y (iv) la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO:
 34 y la SEQ ID NO: 35, respectivamente; y/o (b) la V_L comprende una secuencia
 CDR1 de V_L , una secuencia CDR2 de V_L y una secuencia CDR3 de
 15 V_L seleccionadas entre el grupo que consiste en la (i) SEQ ID NO: 8, la SEQ ID
 NO: 9 y la SEQ ID NO: 10, respectivamente; (ii) la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID
 NO: 19 y la SEQ ID NO: 20, respectivamente; (iii) la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID
 NO: 29 y la SEQ ID NO: 30, respectivamente; y (iv) la SEQ ID NO: 38, la SEQ
 ID NO: 39 y la SEQ ID NO: 40, respectivamente. En determinadas realizaciones,
 20 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno incluye una o más de las
 siguientes características: (a) una secuencia de un dominio variable de cadena
 ligera de inmunoglobulina que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos
 un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de un
 dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina presente en una
 25 cualquiera de las SEQ ID NOs: 7, 17, 27 o 37; y/o (b) una secuencia de un
 dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que es al menos un
 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un
 99 % idéntica a la secuencia de un dominio variable de cadena pesada de
 inmunoglobulina presente en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 12, 22 o 32.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o
 fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable
 de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) y un dominio variable de cadena
 ligera de inmunoglobulina (V_L), en donde: (a) el V_H comprende una secuencia de
 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, la SEQ
 35 ID NO: 12, la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 32; y/o (b) el V_L comprende una

secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 37. En algunas realizaciones del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, la secuencia de aminoácidos V_H y la secuencia de aminoácidos V_L se seleccionan entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 7 (7-I1-B, respectivamente; la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 17 (2-C8-A, respectivamente; la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 27 (10-O18-A, respectivamente; y la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 37 (6-G23-F), respectivamente.

De manera adicional o alternativa, en determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente tecnología se une a un epítipo presente en un polipéptido DLL3 de mamífero. El epítipo puede ser un epítipo conformacional o un epítipo no conformacional. De manera adicional o alternativa, en algunas realizaciones, el polipéptido DLL3 de mamífero comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 50, la SEQ ID NO: 51, la SEQ ID NO: 52, la SEQ ID NO: 53 y la SEQ ID NO: 54. En algunas realizaciones, el polipéptido DLL3 de mamífero tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 27-492 de la SEQ ID NO: 50 o la SEQ ID NO: 51 (por ejemplo, el polipéptido DLL3 de mamífero puede incluir el dominio extracelular de DLL3 humano). De manera adicional o alternativa, en algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al mismo experimenta una internalización intracelular cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al polipéptido DLL3 expresado sobre una superficie celular (por ejemplo, una superficie de célula tumoral).

De manera adicional o alternativa, en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende además un dominio Fc de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD e IgE. De manera adicional o alternativa, en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab', scFv y Fv. De manera adicional o alternativa, en algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo biespecífico.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ácido

nucleico recombinante que codifica cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico recombinante se selecciona del grupo que consiste de: las SEQ ID NOs: 1, 6, 11, 16, 21, 26, 31 y 36.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora o vector que comprende cualquiera de las secuencias de ácido nucleico recombinante divulgadas en el presente documento.

 En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente tecnología y un transportador farmacéuticamente aceptable, en donde el
10 anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está opcionalmente conjugado con un agente seleccionado del grupo que consiste en isótopos, tintes, cromógenos, agentes de contraste, fármacos, toxinas, citocinas, enzimas, inhibidores enzimáticos, hormonas, antagonistas de hormonas, factores de crecimiento,
15 radionucleidos, metales, liposomas, nanopartículas, ARN, ADN o cualesquiera combinaciones de los mismos.

 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer asociado a DLL3 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o
20 fragmento de unión a antígeno de la presente tecnología, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con al menos un agente terapéutico adicional. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, isótopos, fármacos, toxinas, citocinas, enzimas, inhibidores enzimáticos, hormonas, antagonistas de hormonas, factores de
25 crecimiento, radionucleidos, metales, liposomas, nanopartículas, ARN, ADN o cualesquiera combinaciones de los mismos. El cáncer asociado a DLL3 puede ser cáncer de pulmón microcítico, carcinoma neuroendocrino macrocítico, cáncer neuroendocrino pulmonar, cánceres neuroendocrinos extrapulmonares o melanoma.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar los niveles de expresión de la proteína DLL3 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjugan con un marcador
35 detectable; y detectar la señal generada por el marcador detectable en la

muestra biológica.

Se divulgan también en el presente documento kits para la detección y/o tratamiento de los cánceres asociados con DLL3 que comprenden al menos una composición relacionada con inmunoglobulina de la presente tecnología (por ejemplo, cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento) o una variante funcional (por ejemplo, variante de sustitución) del mismo e instrucciones de uso. En determinadas realizaciones, la composición relacionada con inmunoglobulina está acoplada a una o más marcadores detectables. En una realización, el uno o más marcadores detectables comprenden un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o un marcador cromogénico.

De manera adicional o alternativa, en algunas realizaciones, el kit comprende además un anticuerpo secundario que se une específicamente a una composición relacionada con una inmunoglobulina dirigida contra DLL3 descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario está acoplado a al menos un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o un marcador cromogénico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** muestra los resultados del ensayo del Fab ZAP, un ensayo de internalización basado en citotoxicidad, llevado a cabo para evaluar la internalización de DLL3 por los anticuerpos indicados. Se usó un anticuerpo monoclonal SC16 contra DLL3 de referencia como control positivo. Véase el documento WO2015127407. Todos los anticuerpos dirigidos contra DLL3 ensayados presentaron una actividad destructora que fue comparable a la del anticuerpo monoclonal de referencia. Se observó un efecto gancho a concentraciones mayores de los anticuerpos dirigidos contra DLL3 a medida que los anticuerpos anti-DLL3 libres competían con los anticuerpos anti-DLL3 unidos a células por el Fab ZAP.

Las **FIGS. 2A-2D** muestran las curvas de unión de los anticuerpos 7-I1-B (**FIG. 2A**), 6-G23-F (**FIG. 2B**), 10-O18-A (**FIG. 2C**) y 2-C8-A (**FIG. 2D**), medidos con el Octeto HTX a 25 °C usando PBS al 0,1 % BSA al 0,02 % Tween 20 como tampón de unión y glicina 10 mM pH 1,7 como tampón de regeneración. Se cargaron los anticuerpos monoclonales (5 µg/ml cada uno) sobre sensores Fc contra Ig de ratón, y los sensores cargados se sumergieron en las diluciones

indicadas de Proteína DLL3 humana recombinante, (aminoácidos Ala27-Ala479, N.º de Cat. 9749-DL, R&D Systems) a una concentración inicial de 200 nM, con 7 diluciones en serie 1:3. Para cada dilución de DLL3, se muestran la medición real y los ajustes de la curva.

5 La **FIG. 2E** muestra los valores de las constantes de disociación (K_D) de los cuatro anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento (6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A), que se calcularon usando las curvas de unión mostradas en las Figs. 2A-2D y aplicando un modelo de unión monovalente (1:1).

10 La **FIG. 3A** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio V_H del anticuerpo 7-I1-B, representadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente. La CDR1 de V_H (SEQ ID NO: 3) se muestra en negrita, la CDR2 de V_H (SEQ ID NO: 4) está subrayada y la CDR3 de V_H (SEQ ID NO: 5) está indicada en cursiva subrayada.

15 La **FIG. 3B** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio V_L del anticuerpo 7-I1-B, representadas como SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente. La CDR1 de V_L (SEQ ID NO: 8) se muestra en negrita, la CDR2 de V_L (SEQ ID NO: 9) está subrayada y la CDR3 de V_L (SEQ ID NO: 10) está indicada en cursiva subrayada.

20 La **FIG. 4A** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio V_H del anticuerpo 2-C8-A, representadas como SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente. La CDR1 de V_H (SEQ ID NO: 13) se muestra en negrita, la CDR2 de V_H (SEQ ID NO: 14) está subrayada y la CDR3 de V_H (SEQ ID NO: 15) está indicada en cursiva subrayada.

25 La **FIG. 4B** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio V_L del anticuerpo 2-C8-A, representadas como SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, respectivamente. La CDR1 de V_L (SEQ ID NO: 18) se muestra en negrita, la CDR2 de V_L (SEQ ID NO: 19) está subrayada y la CDR3 de V_L (SEQ ID NO: 20) está indicada en cursiva subrayada.

30 La **FIG. 5A** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio V_H del anticuerpo 10-O18-A, representadas como SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, respectivamente. La CDR1 de V_H (SEQ ID NO: 23) se muestra en negrita, la CDR2 de V_H (SEQ ID NO: 24) está subrayada y la CDR3 de V_H (SEQ ID NO: 25) está indicada en cursiva subrayada.

35 La **FIG. 5B** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de

aminoácidos del dominio V_L del anticuerpo 10-O18-A, representadas como SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, respectivamente. La CDR1 de V_L (SEQ ID NO: 28) se muestra en negrita, la CDR2 de V_L (SEQ ID NO: 29) está subrayada y la CDR3 de V_L (SEQ ID NO: 30) está indicada en cursiva subrayada.

5 La **FIG. 6A** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio V_H del anticuerpo 6-G23-F, representadas como SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32, respectivamente. La CDR1 de V_H (SEQ ID NO: 33) se muestra en negrita, la CDR2 de V_H (SEQ ID NO: 34) está subrayada y la CDR3 de V_H (SEQ ID NO: 35) está indicada en cursiva subrayada.

10 La **FIG. 6B** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio V_L del anticuerpo 6-G23-F, representadas como SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37, respectivamente. La CDR1 de V_L (SEQ ID NO: 38) se muestra en negrita, la CDR2 de V_L (SEQ ID NO: 39) está subrayada y la CDR3 de V_L (SEQ ID NO: 40) está indicada en cursiva subrayada.

15 La **FIG. 7** muestra que los anticuerpos monoclonales (mAbs) 6-G23-F, 10-O18-A y 2-C8-A se unen selectivamente a DLL3, pero no a DLL1 o DLL4. El mAb 7-I1-B se une a DLL3 y DLL4, pero no a DLL1.

La **FIG. 8A** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 del ligando Notch 3 convencional de tipo delta (DLL3) de *Homo sapiens*, representadas como SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 50, respectivamente. La **FIG. 8B** muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 del ligando Notch 3 convencional de tipo delta (DLL3) de *Homo sapiens*, representadas como SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 51, respectivamente.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se apreciará que algunos aspectos, modos, realizaciones, variaciones y rasgos de la presente tecnología se describen a continuación con diversos niveles de detalle con el objetivo de proporcionar una comprensión sustancial de la presente tecnología.

30 Al llevar a la práctica los métodos actuales, se usan muchas técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica de proteínas, biología celular, inmunología, microbiología y ADN recombinante. Véanse, por ejemplo, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a edición; la serie Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; 35 la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson *et al.*

(1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson *et al.* (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5ª edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; patente de EE. UU. N.º 4.683.195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres); y Herzenberg *et al.* eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*. Los métodos para detectar y medir niveles de productos de expresión génicos polipeptídicos (es decir, nivel de traducción génica) son bien conocidos en la técnica e incluyen el uso de métodos de detección de polipéptidos tales como detección con anticuerpos y técnicas de cuantificación. (Véanse también, Strachan y Read, *Human Molecular Genetics*, Segunda edición. (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1999)).

DLL3 se expresa selectivamente en tumores neuroendocrinos pulmonares de grado alto incluidos CPM y CNEM. Se observó un aumento en la expresión de DLL3 en tumores xenoinjertados derivados de pacientes con CPM y CNEM. Véase Saunders *et al.*, *Sci Translational Medicine* 7(302): 302ra136 (2015). Se ha observado también el aumento de la expresión de DLL3 en cánceres neuroendocrinos extrapulmonares incluido el carcinoma neuroendocrino de próstata (Puca *et al.*, *Sci Transl Med* 11(484): pii: eaav0891 (2019). Aunque DLL3 se expresa en la superficie de dichas células tumorales, no se expresa en tejidos normales. La presente divulgación proporciona composiciones relacionadas con inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), que se internalizan durante la unión a DLL3 en las células tumorales y por lo tanto son útiles para administrar una carga útil tóxica a estas células tumorales. Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología son útiles en métodos para detectar o tratar cánceres asociados con DLL3 en un sujeto que lo necesita. Por consiguiente, los diversos aspectos de los presentes métodos se refieren a la

preparación, caracterización y manipulación de anticuerpos dirigidos contra DLL3. Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología son muy útiles en solitario o combinadas con agentes terapéuticos adicionales para tratar el cáncer. En algunas realizaciones, la composición relacionada con inmunoglobulina es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo biespecífico.

Definiciones

A continuación, se proporcionan las definiciones de determinados términos tal y como se utilizan en esta memoria descriptiva. A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen en general el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente tecnología.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares. En general, la nomenclatura y los procedimientos de laboratorio que se utilizan en el presente documento, en cultivo celular, genética molecular, química orgánica, química analítica y química e hibridación de ácidos nucleicos que se describen a continuación son bien conocidas y habitualmente empleadas en la técnica.

Como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" en referencia a un número debe tomarse generalmente para incluir números comprendidos en un intervalo del 1 %, el 5 % o el 10 % en cualquier dirección (superior o inferior) con respecto al número, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicho número sea inferior al 0 % o supere el 100 % de un valor posible).

Como se utiliza en el presente documento, la "administración" de un agente o fármaco a un sujeto incluye cualquier vía de introducción o administración a un sujeto de un compuesto para realizar su función prevista. La administración se puede llevar a cabo mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo las vías oral, intranasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea), vía rectal, vía intratecal, intratumoral o tópica. La administración incluye la autoadministración y la administración por un tercero.

Un "adyuvante" se refiere a una o más sustancias que producen la estimulación del sistema inmunitario. En este contexto, se utiliza un adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos de vacuna o anticuerpos. Un adyuvante se puede administrar a un sujeto antes, junto con, o
5 después de la administración de la vacuna. Los ejemplos de compuestos químicos utilizados como adyuvantes incluyen compuestos de aluminio, aceites, polímeros de bloque, complejos inmunoestimulantes, vitaminas y minerales (por ejemplo, vitamina E, vitamina A, selenio y vitamina B12), Quil A (saponinas), componentes de la pared celular bacteriana y fúngica (por ejemplo,
10 lipopolisacáridos, lipoproteínas y glicoproteínas), hormonas, citocinas y factores de coestimulación.

Como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido" se usa para referirse a cualquier molécula orgánica que contiene al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxilo. Típicamente, al menos un grupo amino
15 está en la posición α con respecto al grupo carboxilo. El término "aminoácido" incluye tanto aminoácidos de origen natural como aminoácidos sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de manera similar a la de los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos
20 aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que la de un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo,
25 homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de
30 la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos se pueden citar en el presente documento bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se

refiere colectivamente a inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina que incluyen como ejemplo y no como limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones, así como en especies no de mamífero, tales como inmunoglobulinas de tiburón. Como se utiliza en el presente documento, los "anticuerpos" (incluye inmunoglobulinas intactas) y "fragmentos de unión a antígeno" se unen específicamente a una molécula de interés (o a un grupo de moléculas de interés muy similares) con la exclusión sustancial de unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que tienen una constante de unión para la molécula de interés que es al menos 10^3 M^{-1} mayor, al menos 10^4 M^{-1} mayor o al menos 10^5 M^{-1} mayor que la constante de unión para otras moléculas de una muestra biológica). El término "anticuerpo" también incluye formas modificadas por ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véanse también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., *Immunology*, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Más particularmente, anticuerpo se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina o una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominadas región variable pesada (V_H) y región variable ligera (V_L). En conjunto, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo. Típicamente, una inmunoglobulina tiene cadenas pesadas (H) y ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones también se denominan "dominios"). En combinación, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres

regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". La extensión de la región marco y las CDR se han definido (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, que se incorpora en el

5 presente documento por referencia). La base de datos de Kabat actualmente se encuentra en línea. Las secuencias de las regiones marco conservadas de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, esto es, las regiones marco conservadas combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes,

10 adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β . Por tanto, las regiones marco actúan formando un armazón que posibilita el posicionamiento de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercadena no covalentes.

15 Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítopo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente empezando desde el extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que está ubicada la CDR particular. Por tanto, una CDR3 V_H está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada

20 del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo que se une a la proteína DLL3 tendrá una región V_H específica y la secuencia de la región V_L y, por lo tanto, secuencias específicas de CDR. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de

25 combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solamente un número limitado de posiciones de los aminoácidos de las CDR están directamente implicadas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan restos determinantes de la complementariedad (SDR). "Composiciones relacionadas con la inmunoglobulina" como se utiliza en el presente documento, se refiere a

30 anticuerpos (incluidos anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos recombinantes, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos biespecíficos, *etc.*.) así como fragmentos de anticuerpos. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del

35 mismo se une específicamente a un antígeno.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido relacionado con anticuerpo" significa fragmentos de anticuerpo de unión con el antígeno, incluyendo anticuerpos monocatenarios, que comprenden la una o más regiones variables solas o en combinación, con todo o parte de los siguientes elementos: región bisagra, dominios CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de anticuerpo. También se incluyen en la tecnología cualesquiera combinaciones de regiones variables y región bisagra, dominios CH₁, CH₂ y CH₃. Las moléculas relacionadas con anticuerpos de utilidad en los presentes métodos, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs con enlaces disulfuro (sdFv), y fragmentos que comprenden un dominio tanto V_L como V_H. Los ejemplos incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y CH₁; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH₁; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989)) que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Así, "fragmentos de anticuerpo" o "fragmentos de unión a antígeno" puede comprender una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

"Anticuerpo biespecífico" o "BsAb", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se puede unir simultáneamente a dos dianas que tienen diferente estructura, por ejemplo, dos antígenos diana diferentes, dos epítomos diferentes en el mismo antígeno diana. En la técnica se conoce diversas estructuras de anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, cada resto de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico incluye regiones V_H y/o V_L; en algunas realizaciones de este tipo, las regiones V_H y/o V_L son las que se encuentran en un determinado anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico contiene dos restos de unión a antígeno, incluyendo cada uno regiones V_H y/o V_L de diferentes anticuerpos

monoclonales. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico contiene dos restos de unión a antígeno, en donde uno o dos de los restos de unión a antígeno incluye una molécula de inmunoglobulina que tiene regiones V_H y/o V_L que contienen las CDR de un primer anticuerpo monoclonal, y el otro resto de unión a antígeno incluye un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fd, Fv, dAB, scFv, etc.) que tienen regiones V_H y/o V_L que contienen las CDR de un segundo anticuerpo monoclonal.

Como se utiliza en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a la asociación de dos moléculas por cualquier método conocido de los expertos en la materia. Los tipos de asociaciones adecuados incluyen enlaces químicos y enlaces físicos. Los enlaces químicos incluyen, por ejemplo, enlaces covalentes y enlaces coordinados. Los enlaces físicos incluyen, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolares, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas y apilamiento aromático.

Como se utiliza en el presente documento, el término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos con más detalle en, por ejemplo, los documentos EP 404097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "anticuerpos monocatenarios" o "Fv monocatenario (scFv)" se refieren a una molécula de fusión de anticuerpo de los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H . Las moléculas de anticuerpo monocatenario pueden comprender un polímero con varias moléculas individuales, por ejemplo, un dímero, trímero u otros polímeros. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , estén codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarias (scFv)). Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426 y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad*

Sci. USA 85:5879-5883. Dichos anticuerpos monocatenarios se pueden preparar mediante técnicas recombinantes o escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

5 Cualquiera de los fragmentos de anticuerpo anteriormente citados se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se seleccionan según la especificidad de unión y la actividad de neutralización de la misma forma que los anticuerpos intactos.

10 Como se utiliza en el presente documento, un "antígeno" se refiere a una molécula a la que se une selectivamente un anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo). El antígeno diana puede ser una proteína, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto sintético o natural. En algunas realizaciones, el antígeno diana puede ser un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido DLL3 que incluye el dominio extracelular de DLL3). Un antígeno también se puede administrar a un animal para generar una respuesta
15 inmunitaria en el animal.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmentos de la estructura completa de la inmunoglobulina que tiene una parte del polipéptido responsable de la unión al antígeno. Los ejemplos del fragmento de unión a antígeno de utilidad en la presente tecnología incluyen scFv, (scFv)₂,
20 scFv-Fc, Fab, Fab' y F(ab')₂, aunque no de forma limitativa.

Por "afinidad de unión" se entiende la fuerza de las interacciones no covalentes totales entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su molécula asociada (por ejemplo, un antígeno o péptido antigénico). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar
25 habitualmente por su constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Un complejo de baja afinidad contiene un anticuerpo que generalmente tiende a disociarse rápidamente del antígeno, mientras que un complejo de alta afinidad contiene un anticuerpo que tiende generalmente a
30 permanecer unido al antígeno durante más tiempo.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "muestra biológica" significa material de muestra derivado de células vivas. Las muestras biológicas pueden incluir tejidos, células, proteína o extractos de membrana de células, y los fluidos biológicos (por ejemplo, líquido ascítico o líquido cefalorraquídeo (CSF)) aislado de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos
35

presentes dentro de un sujeto. Las muestras biológicas de la presente tecnología incluyen, aunque no de forma limitativa, muestras tomadas del tejido mamario, tejido renal, el cuello de útero, el endometrio, la cabeza o cuello, la vesícula biliar, el tejido paratiroideo, la próstata, el cerebro, la glándula pituitaria, tejido renal, músculo, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el colon, hígado, el bazo, el páncreas, tejido tiroideo, tejido cardíaco, tejido pulmonar, la vejiga, tejido adiposo, tejido de ganglios linfáticos, el útero, tejido ovárico, tejido suprarrenal, tejido testicular, las amígdalas, timo, sangre, cabello, bucal, piel, suero, plasma, LCR, semen, líquido prostático, líquido seminal, orina, heces, sudor, saliva, esputo, moco, médula ósea, linfa y lágrimas. Las muestras biológicas también se pueden obtener de biopsias de órganos internos o de cánceres. Las muestras biológicas se pueden obtener de sujetos para el diagnóstico o la investigación o bien se pueden obtener de individuos no enfermos, como controles o para investigación básica. Las muestras se pueden obtener mediante métodos convencionales que incluyen, por ejemplo, venopunción y biopsia quirúrgica. En determinadas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de esputo o un tejido obtenido de una biopsia mediante aguja o biopsia quirúrgica.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo con CDR injertado" se refiere a un anticuerpo en el que al menos una de CDR un anticuerpo "aceptor" se sustituye por una CDR "injertada" procedente de un anticuerpo "donante" que tiene una especificidad de antígeno deseable.

Como se utiliza en el presente documento, un término "anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en el que la región constante Fc de un anticuerpo monoclonal de una especie (por ejemplo, una región constante Fc de ratón) se sustituye, usando técnicas de ADN recombinante, por una región constante Fc de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, una región constante Fc humana). Véanse, en general, Robinson *et al.*, documento PCT /US86/02269; Akira *et al.*, solicitud de patente europea 184187; Taniguchi, solicitud de patente europea 171496; Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173494; Neuberger *et al.*, WO 86/01533; Studnicka *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea 0125,023; 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.*, *Cancer 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.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "FR de consenso" significa una región marco (FR) de anticuerpo en una secuencia de inmunoglobulina de consenso. Las regiones FR de un anticuerpo no entran en
5 contacto con el antígeno.

Como se utiliza en el presente documento, un "control" es una muestra alternativa usada en un experimento a fines comparativos. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, cuando el fin del experimento es determinar una correlación de la eficacia de un agente terapéutico para el tratamiento de un
10 tipo concreto de enfermedad, un control positivo (un compuesto o composición conocidos por presentar el efecto terapéutico deseado) y un control negativo (un sujeto o una muestra que no recibe la terapia o recibe un placebo) se emplean normalmente.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que da como resultado la prevención o la disminución de una enfermedad o dolencia descrita en el presente documento o uno o más signos o síntomas asociados con una enfermedad o dolencia descrita en el presente documento. En el contexto de
15 aplicaciones terapéuticas o profilácticas, la cantidad de una composición administrada al sujeto variará dependiendo de la composición, el grado, tipo y gravedad de la enfermedad, y de las características del sujeto, tales como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a los fármacos. El experto en la materia podrá determinar las dosis adecuadas dependiendo de
20 estos y otros factores. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En los métodos descritos en el presente documento, las composiciones terapéuticas pueden administrarse a un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de una enfermedad o afección descrita en este documento. Como se utiliza en el
25 presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición se refiere a niveles de composición en que los efectos fisiológicos de una enfermedad o afección se mejoran o eliminan. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede administrarse en una o más administraciones.

Un polipéptido o péptido "aislado" o "purificado" está prácticamente
35 exento de material celular u otros polipéptidos contaminantes de la célula, tejido

o fuente de tejido de células de la que se deriva el agente, o bien prácticamente exento de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno dirigidos contra DLL3 aislados de la presente tecnología estarían exentos de
5 materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del agente. Dichos materiales interferentes pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "epítopo" significa un determinante de proteína que puede unirse específicamente a un anticuerpo.
10 Los epítopos consisten habitualmente en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como cadenas laterales de aminoácidos o glucídicas y, habitualmente, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que se
15 pierde la unión del primero pero no la del segundo en presencia de disolventes desnaturalizantes. En algunas realizaciones, un "epítopo" de la proteína DLL3 es una región de la proteína con la que se unen específicamente los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología. En algunas realizaciones, el epítopo es un epítopo conformacional o un epítopo no conformacional. Para
20 cribar los anticuerpos dirigidos contra DLL3 que se unen a un epítopo, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo se puede usar para determinar si un anticuerpo dirigido contra DLL3 se une al mismo sitio o epítopo que un anticuerpo dirigido
25 contra DLL3 de la presente tecnología. De forma alternativa o adicional, se puede llevar a cabo el cartografiado de epítopos mediante métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, se puede mutagenizar la secuencia del anticuerpo tal como mediante un barrido de alanina, para identificar restos de contacto. En un método diferente, los péptidos que corresponden a diferentes regiones de DLL3 se
30 pueden usar en ensayos de competición con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítopo caracterizado o conocido.

Como se utiliza en el presente documento, "expresión" incluye uno o más de los siguientes: transcripción de del gen al ARNm precursor; corte y empalme y otro procesamiento del ARNm precursor para producir ARNm maduro;
35 estabilidad del ARNm; traducción del ARNm maduro en proteína (incluyendo el

uso de codones y la disponibilidad de ARNt); y glicosilación y/u otras modificaciones del producto de traducción, si es necesario para una expresión y funcionamiento correctos.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "gen" significa un segmento de ADN que contiene toda la información necesaria para la biosíntesis regulada de un producto de ARN, incluidos los promotores, exones, intrones y otras regiones no traducidas que controlan la expresión.

10 Como se utiliza en el presente documento, "homología" o "identidad" o "similitud" se refieren a la similitud de la secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácidos nucleicos. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear a efectos de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El grado de homología entre secuencias depende del número de

15 posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Un polinucleótido o región polinucleotídica (o un polipéptido o región polipeptídica) tiene un determinado porcentaje (por ejemplo, al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o

20 aminoácidos) es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, se usan parámetros predeterminados para la alineación. Un programa de alineación es BLAST, usando parámetros predeterminados. En particular, los programas

25 son BLASTN y BLASTP, usando los parámetros predeterminados siguientes: código genético= estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; corte = 60; expectativa = 10; Matriz= BLOSUM62; Descripciones=50 secuencias; clasificado por =PUNTUACIÓN ALTA; bases de datos=no redundantes, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS

30 translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en el National Center for Biotechnology Information. Polinucleótidos biológicamente equivalentes son aquellos que tienen la homología porcentual especificada y que codifican un polipéptido que tiene la misma actividad biológica o una similar. Dos secuencias se consideran "no

35 relacionadas" o "no homólogas" si comparten menos del 40 % de identidad, o

menos del 25 % de identidad, entre sí.

Como se utiliza en el presente documento, las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana.

5 En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los restos de la región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas realizaciones, los restos de la región
10 marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de
15 unión. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv), en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de la
20 inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoren la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR es generalmente no más de 6 en la cadena H, y en la cadena L, no más de 3. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de
25 inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase, por ejemplo, Ahmed y Cheung, *FEBS Letters* 588(2):288-297 (2014); Saxena y Wu, *Frontiers in immunology* 7: 580 (2016).

30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende, de forma general, los restos de aminoácido de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de los restos 24-34 (L1),
35 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L, y aproximadamente alrededor de 31-35B (H1),

50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la V_H (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) de la V_L , y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) de la V_H (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))).

Como se utiliza en el presente documento, los términos "idéntico" o "identidad" porcentual, cuando se utilizan en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas o de ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad en una región determinada (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento, o una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo descrito en el presente documento)), cuando se comparan y se alinean para obtener una correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada) tal como se determina utilizando algoritmos de comparación de secuencias como BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predeterminados descritos a continuación, o mediante alineación manual e inspección visual (por ejemplo, el sitio web de NCBI). Dichas secuencias se denominan, por tanto, "prácticamente idénticas". Este término también se refiere, o puede aplicarse, al complemento de una secuencia de prueba. El término también incluye secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. En algunas realizaciones, existe identidad en una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo intacto" o "inmunoglobulina intacta" significa un anticuerpo que comprende al menos dos polipéptidos de cadena pesada (H) y dos polipéptidos de cadena ligera (L) interconectados por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está formada por tres dominios, CH_1 , CH_2 y CH_3 . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera

(abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está formada por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR₁, CDR₁, FR₂, CDR₂, FR₃, CDR₃, FR₄. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "individuo", "paciente" o "sujeto" pueden ser un organismo individual, un vertebrado, un mamífero o un ser humano. En algunas realizaciones, el individuo, paciente o sujeto es un ser humano.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo que se ha derivado de un clon único, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago y no al método mediante el que se produce. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión única por un epítipo particular. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, al contrario de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe considerarse que requiera la producción

del anticuerpo mediante cualquier procedimiento en particular. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en la materia entre las que se incluyen, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, técnicas de hibridomas, recombinación y expresión en fagos.

5 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con los presentes métodos pueden elaborarse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975) o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también
10 pueden aislarse a partir de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los
15 disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, compuestos antibacterianos y antifúngicos, compuestos isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los transportadores farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones son conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Remington's
20 Pharmaceutical Sciences (20ª edición, ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.).

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo policlonal" significa una preparación de anticuerpos derivados de al menos dos
(2) línea de células productoras de anticuerpos diferentes. El uso de este término
25 incluye preparaciones de al menos dos (2) anticuerpos que contienen anticuerpos que se unen específicamente a diferentes epítopos o regiones de un antígeno.

Como se utiliza en el presente documento, el término "polinucleótido" o "ácido nucleico" significa cualquier ARN o ADN, que puede ser ARN o ADN no
30 modificado o modificado. Los polinucleótidos incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, y moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más habitualmente, bicatenarias o una mezcla de regiones
35 mono y bicatenarias. Además, "polinucleótido" se refiere a regiones tricatenarias

que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con cadenas principales modificadas para mayor estabilidad o por otras razones.

5 Como se utiliza en el presente documento, los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para denotar un polímero que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. Polipéptido se refiere tanto a cadenas cortas, habitualmente
10 denominadas péptidos, glicopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccion, o mediante
15 técnicas de modificación química que son bien conocidas en este campo.

 Como se utiliza en el presente documento, "prevención" o "que previene" de un trastorno o afección se refiere a uno o más compuestos que, en una muestra estadística, reducen la aparición del trastorno o dolencia en la muestra tratada en relación con la muestra de control sin tratar, o retrasan o reducen la
20 gravedad de uno o más síntomas del trastorno o dolencia en relación con la muestra de control in tratar.

 Como se utiliza en el presente documento, el término "recombinante" cuando se utiliza en referencia, por ejemplo, a una célula, o un ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha
25 modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o la alteración de un ácido nucleico o proteína natural, o que el material se ha derivado de una célula modificada de esta forma. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que de otra forma se
30 expresarían de forma anómala, expresados en baja cantidad, o no expresados en absoluto.

 Como se utiliza en el presente documento, el término uso terapéutico "separado" se refiere a la administración de al menos dos principios activos al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo por diferentes vías.

35 Como se utiliza en el presente documento, la expresión uso terapéutico

"secuencial" se refiere a la administración de al menos dos principios activos en diferentes momentos, siendo la vía de administración idénticos o diferentes. Más particularmente, el uso secuencial se refiere a la administración completa de uno de los principios activos antes de comenzar la administración del otro u otros. Es por tanto posible administrar uno de los principios activos durante varios minutos, horas o días antes de administrar el otro principio otros principios activos. En este caso no hay tratamiento simultáneo.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión uso terapéutico "simultáneo" se refiere a la administración de al menos dos principios activos por la misma vía y al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo.

Como se utiliza en el presente documento, "se une específicamente" se refiere a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) que reconoce y se une a otra molécula (por ejemplo, un antígeno), pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas. Las expresiones "unión específica", "se une específicamente a", o es "específico de" una molécula en particular (por ejemplo, un polipéptido o un epítipo de un polipéptido), como se utiliza en el presente documento, se puede presentar, por ejemplo, en una molécula que tiene una K_D para la molécula con la que se une de aproximadamente 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. La expresión "se une específicamente" también se puede referir a la unión donde una molécula (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) se une a un polipéptido en particular (por ejemplo, un polipéptido de DLL3), o un epítipo de un polipéptido en particular, sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" pretende denotar un compuesto que, cuando está presente en una cantidad eficaz, produce un efecto terapéutico deseado en un sujeto que lo necesita.

"Tratar" o "tratamiento" como se utiliza en el presente documento incluye el tratamiento de una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento, en un sujeto, tal como un ser humano, e incluye: (i) inhibir una enfermedad o trastorno, es decir, detención de su desarrollo; (ii) aliviar una enfermedad o trastorno, es decir, producir la regresión del trastorno; (iii) ralentizar la progresión del trastorno; y/o (iv) inhibir, aliviar o ralentizar la progresión de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, tratamiento

significa que los síntomas asociados con la enfermedad quedan, por ejemplo, aliviados, reducidos, curados o puestos en un estado de remisión.

- También se apreciará que los diversos modos de tratamiento de trastornos que se describen en el presente documento se entienden que significan "sustancial", que incluye el tratamiento total pero también menos del tratamiento total, y en donde se consigue algún resultado biológica o médicamente relevante. El tratamiento puede ser un tratamiento prolongado continuado para una enfermedad crónica o una única administración, o unas pocas administraciones para el tratamiento de una dolencia aguda.
- Se contemplan la modificación o modificaciones de los anticuerpos de DLL3 descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de DLL3 introduciendo los cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para obtener el anticuerpo de interés, siempre que el anticuerpo obtenido tenga las propiedades deseadas. La modificación también incluye el cambio en el modelo de glicosilación de la proteína. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las "sustituciones conservativas" se muestran en la Tabla siguiente.

Sustituciones de aminoácidos		
Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones conservativas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala

Sustituciones de aminoácidos		
Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones conservativas
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando una biblioteca de presentación en fagos. Específicamente, varios sitios en la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del paquete M13 en cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se seleccionan a continuación según su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. De forma alternativa o adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura

cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades similares o superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Tipo Delta 3 (DLL3)

En *Drosophila*, La señalización de Notch está mediada principalmente por el receptor Notch. Delta es uno de los ligandos de Notch de *Drosophila* que activa la señalización en células adyacentes. Los seres humanos tienen cuatro receptores Notch conocidos (NOTCH1 a NOTCH4) y tres homólogos de Delta, denominados ligandos de tipo delta: DLL1, DLL3 y DLL4. Se ha notificado que, a diferencia de DLL1 y DLL4, DLL3 inhibe la señalización de Notch en lugar de activarla.

DLL3 (conocida también como tipo Delta 3 o SCDO1) es un miembro de la familia de tipo Delta de los ligandos DSL de Notch. Los ortólogos de la proteína DLL3 representativos incluyen, aunque no de forma limitativa, ser humano (números de registro. NP_058637 (SEQ ID NO: 50) y NP_982353 (SEQ ID NO: 51)), chimpancé (n.º de registro. XP_003316395 (SEQ ID NO: 52)), ratón (n.º de registro NP_031892 (SEQ ID NO: 53)), y rata (n.º de registro NP_446118 (SEQ ID NO: 54)). En los seres humanos, el gen DLL3 consisten en 8 exones que se extienden 9,5 kpb localizados en el cromosoma 19q13. Un corte y empalme alternativo dentro del último exón da lugar a un transcrito de 2389 pb (n.º de registro NM_016941 (SEQ ID NO: 55)) y a un transcrito de 2052 pb (n.º de registro NM_203486 (SEQ ID NO: 56)). El primer transcrito codifica una proteína que tiene 618 aminoácidos de longitud (n.º de registro NP_058637 (SEQ ID NO: 50)), mientras que el última codifica una proteína que tiene 587 aminoácidos de longitud (n.º de registro NP_982353 (SEQ ID NO: 51)). Véanse las **FIGS. 8A-8B**. Estas dos isoformas de proteínas DLL3 comparten una identidad global del 100 % a través de sus dominios extracelulares y sus dominios transmembrana, diferenciándose solo en que la isoforma más larga contiene una cola citoplásmica extendida que contiene 32 restos adicionales en el extremo carboxi de la proteína.

Ambas isoformas pueden detectarse en células tumorales. De hecho, la

expresión anómala de DLL3 (genotípica y/o fenotípica) se asocia con diversas subpoblaciones de células tumorigénicas tales como citoblastos cancerosos y células iniciadoras de tumores. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona anticuerpos contra DLL3 que pueden ser particularmente útiles para dirigirse a dichas células (por ejemplo, citoblastos cancerosos, células iniciadoras de tumores y cánceres, por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma neuroendocrino macrocítico, cánceres neuroendocrinos pulmonares, cánceres neuroendocrinos extrapulmonares, y melanoma), facilitando así el tratamiento, la gestión o la prevención de trastornos neoplásicos.

10 **Composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología**

La presente tecnología describe métodos y composiciones para la generación y uso de composiciones relacionadas con inmunoglobulina dirigidas contra DLL3 (por ejemplo, anticuerpos anti-DLL3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos). Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas dirigidas contra DLL3 de la presente divulgación se puedan usar en el diagnóstico o tratamiento de cánceres asociados con DLL3 (por ejemplo cáncer de pulmón microcítico, carcinoma neuroendocrino macrocítico, cánceres neuroendocrinos pulmonares, cánceres neuroendocrinos extrapulmonares, y melanoma). Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas dirigidas contra DLL3 comprendidas en el alcance de la presente tecnología incluyen, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanizados, biespecíficos y diacuerpos que se unen específicamente al polipéptido diana, un homólogo, derivado o fragmento del mismo. La presente divulgación también proporciona fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos anti-DLL3 divulgados en el presente documento, en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab)'2, Fab', scF_v y F_v.

La presente tecnología divulga anticuerpos dirigidos contra DLL3 que pueden promover la internalización del complejo DLL3-anticuerpo y son por tanto útiles para administrar cargas útiles tóxicas a células tumorales.

Las FIGS. 3-6 proporcionan las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de V_H y V_L así como las secuencias CDR de los anticuerpos divulgados en el presente documento (SEQ ID NOS: 1-40). La siguiente Tabla proporciona también secuencias de aminoácidos de V_H y V_L así como las secuencias de CDR

de los anticuerpos divulgados en el presente documento.

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 2	Secuencia de aminoácidos de V _H de 7-I1-B	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNTWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKSDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTQYYWNSFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 3	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _H de 7-I1-B	GFTFSNTW
SEQ ID NO: 4	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _H de 7-I1-B	IKSKSDGGTT
SEQ ID NO: 5	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _H de 7-I1-B	TQYYWNSFDY
SEQ ID NO: 7	Secuencia de aminoácidos de V _L de 7-I1-B	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQ QYDNLPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 8	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _L de 7-I1-B	QASQDISNYLN
SEQ ID NO: 9	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _L de 7-I1-B	DASNLET

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 10	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _L de 7-I1-B	QQYDNLPLT
SEQ ID NO: 12	Secuencia de aminoácidos de V _H de 2-C8-A	EVQLVESGGGLVQPGGSQRLSCAASGFT FSSYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDG SEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQG TLVTVSS
SEQ ID NO: 13	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _H de 2-C8-A	GFTFSSY
SEQ ID NO: 14	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _H de 2-C8-A	KEDGSE
SEQ ID NO: 15	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _H de 2-C8-A	DPGWAPFDY
SEQ ID NO: 17	Secuencia de aminoácidos de V _L de 2-C8-A	DIQMSQSPSSLSASVGDRVITICRASQGI SNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGV PSKFSGSGSGTDFTLAISLQPEDFATYY CQQYNSFPYTFGQGTTLEIK
SEQ ID NO: 18	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _L de 2-C8-A	RASQGISNYLA
SEQ ID NO: 19	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _L de 2-C8-A	AASSLQS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 20	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _L de 2-C8-A	QQYNSFPYT
SEQ ID NO: 22	Secuencia de aminoácidos de V _H de 10-O18-A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSI NSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIFYSGITN YNPSLKS RV TISLDT SKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARIGVAGFYFDYWGQGTLVTV SS
SEQ ID NO: 23	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _H de 10-O18-A	GG SINSY
SEQ ID NO: 24	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _H de 10-O18-A	FYSGI
SEQ ID NO: 25	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _H de 10-O18-A	IGVAGFYFDY
SEQ ID NO: 27	Secuencia de aminoácidos de V _L de 10-O18-A	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSV SSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGTSPLTFGGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 28	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _L de 10-O18-A	RASQSVSSSYLA
SEQ ID NO: 29	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _L de 10-O18-A	GASSRAT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 30	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _L de 10-O18-A	QQYGTSPILT
SEQ ID NO: 32	Secuencia de aminoácidos de V _H de 6-G23-F	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTSYIHWVRQAPGQGLEWMGIIDPSDGS TNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDVAVYYCARDREYNYYGLDVWGQG TTVTVSS
SEQ ID NO: 33	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _H de 6-G23-F	GYTFTSY
SEQ ID NO: 34	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _H de 6-G23-F	DPSDGS
SEQ ID NO: 35	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _H de 6-G23-F	DREYNYYGLDV
SEQ ID NO: 37	Secuencia de aminoácidos de V _L de 6-G23-F	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSL VYRDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVS NRDSGVPDRFRGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCMQGTHWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 38	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _L de 6-G23-F	RSSQSLVYRDGNTYLN
SEQ ID NO: 39	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _L de 6-G23-F	KVSNRDS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 40	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _L de 6-G23-F	MQGTHWPPT

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) y un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), en donde (a) la V_H comprende una secuencia CDR1 de V_H, una secuencia CDR2 de V_H y una secuencia CDR3 de V_H seleccionadas entre el grupo que consiste en la (i) SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente; (ii) la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 15, respectivamente; (iii) la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, respectivamente; y (iv) la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 35, respectivamente; y/o (b) la V_L comprende una secuencia CDR1 de V_L, una secuencia CDR2 de V_L y una secuencia CDR3 de V_L seleccionadas entre el grupo que consiste en la (i) SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10, respectivamente; (ii) la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20, respectivamente; (iii) la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 30, respectivamente; y (iv) la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39 y la SEQ ID NO: 40, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además un dominio Fc de cualquier isotipo, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, IgG (que incluye IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4), IgA (incluidas IgA1 e IgA2), IgD, IgE o IgM e IgY. Los ejemplos no limitativos de secuencias de la región constante incluyen:

Región constante de la IgD humana, Uniprot: P01880 (SEQ ID NO: 41)

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMGTQSQ
PQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWP
ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEEQEE
RETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWE
VAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLP
PQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLE
DQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHED
SRTLLNASRSLEVSyvTDHGPMK

Región constante de IgG1 humana, Uniprot: P01857 (SEQ ID NO: 42)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
5 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG2 humana, Uniprot: P01859 (SEQ ID NO: 43)

10 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISV
15 EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG3 humana, Uniprot: P01860 (SEQ ID NO: 44)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELK
20 TPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTP
PPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFK
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALH
25 NRFTQKSLSLSPGK

Región constante de IgM humana, Uniprot: P01871 (SEQ ID NO: 45)

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNS
DISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKN
VPLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGK
30 QVGSGVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLT
FQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTITYDSVTISWT
RQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHDLP
PLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV FVQW
MQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHE
35 ALPNRV TERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSD TAGTCY

Región constante de IgG4 humana, Uniprot: P01861 (SEQ ID NO: 46)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQ
5 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLGLGK

Región constante de IgA1 humana, Uniprot: P01876 (SEQ ID NO: 47)

10 ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGV
TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP
CPVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLR
DASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGTKFTFC
TAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPK
15 DVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVA AEDWKKGDT
FSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Región constante de IgA2 humana, Uniprot: P01877 (SEQ ID NO: 48)

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQN
VTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTV
20 PCPVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPS
SGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLT
ANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQ
ELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALP
LAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

25 Región constante de Ig kappa humana, Uniprot: P01834 (SEQ ID NO: 49)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

30 En algunas realizaciones, las composiciones relacionadas con
inmunoglobulinas de la presente tecnología comprenden una región constante
de cadena pesada que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un
90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o es un 100 % idéntica a las SEQ ID
NOS: 41-48. De manera adicional o alternativa, en algunas realizaciones, las
composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología
35 comprenden una región constante de cadena ligera que es al menos un 80 %, al

menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o es un 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 49. En algunas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología se unen al dominio extracelular de DLL3. En algunas realizaciones, el epítipo es un epítipo conformacional.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición relacionada con una inmunoglobulina aislada (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de una inmunoglobulina de cadena pesada (V_H) que comprende la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 32 o una variante de la misma que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

De manera adicional o alternativa, en algunas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología comprenden una secuencia de aminoácidos del dominio variable y la inmunoglobulina de cadena ligera (V_L) que comprende la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 37 o una variante de la misma que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

En algunas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología comprenden una secuencia de aminoácidos del dominio variable de una inmunoglobulina de cadena pesada (V_H) y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de una inmunoglobulina de cadena ligera (V_L) seleccionadas entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 7 (7-I1-B); la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 17 (2-C8-A); la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 27 (10-O18-A); y la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 37 (6-G23-F), respectivamente.

En cualquiera de las realizaciones anteriores de las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas, las secuencias de los dominios variables HC y LC de la inmunoglobulina forman un sitio de unión a antígeno que se une al dominio extracelular de DLL3. En cualquiera de las realizaciones anteriores de las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas, las secuencias de los dominios variables HC y LC de la inmunoglobulina forman un sitio de unión a antígeno que se une a DLL3 y promueve la internalización de la composición relacionada con la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el epítipo es un epítipo conformacional.

En algunas realizaciones, las secuencias de los dominios variables HC y LC de la inmunoglobulina son componentes de la misma cadena polipeptídica. En otras realizaciones, las secuencias de los dominios variables HC y LC de la inmunoglobulina son componentes de diferentes cadenas polipeptídicas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

En algunas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología se unen específicamente a al menos un polipéptido de DLL3. En algunas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología se unen al menos a un polipéptido de DLL3 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. En ciertas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas son anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos biespecíficos. En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden una región marco de anticuerpo humano.

En determinadas realizaciones, la composición relacionada con inmunoglobulina incluye una o más de las siguientes características: (a) una secuencia de un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina presente en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 7, 17, 27 o 37; y/o (b) una secuencia de un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina presente en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 12, 22 o 32. En otro aspecto, uno o más restos de aminoácidos de las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas proporcionadas en el presente documento están sustituidos por otro aminoácido. La sustitución puede ser una "sustitución conservativa" como se define en el presente documento.

En determinadas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas contienen una región constante de IgG1 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N297A y K322A. De manera adicional o alternativa, en algunas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas contienen una región

constante de IgG4 que comprende una mutación S228P.

En algunos aspectos, las composiciones relacionadas con inmunoglobulina dirigidas contra DLL3 descritas en el presente documento contienen modificaciones estructurales para facilitar una rápida unión y captura celular y/o una liberación lenta. En algunos aspectos, la composición relacionada con inmunoglobulina dirigida contra DLL3 de la presente tecnología (por ejemplo, un anticuerpo) puede contener una delección en la región constante de la cadena pesada CH2 para facilitar una rápida unión y captura celular y/o una liberación lenta. En algunos aspectos, se usa un fragmento Fab para facilitar una rápida unión y captura celular y/o una liberación lenta. En algunos aspectos, se usa un fragmento F(ab)₂ para facilitar una rápida unión y captura celular y/o una liberación lenta.

En un aspecto, la presente tecnología proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas descritas en el presente documento. También se divulgan en el presente documento secuencias de ácido nucleico recombinante que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 6, 11, 16, 21, 26, 31 y 36.

En otro aspecto, la presente tecnología proporciona una célula hospedadora o vector de expresión que expresa cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas descritas en el presente documento.

Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra DLL3) pueden ser monoespecíficas, biespecíficas, triespecíficas o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos de diferentes epítomos de uno o más polipéptidos de DLL3, o pueden ser específicos tanto para polipéptidos de DLL3 como para composiciones heterólogas, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60-69 (1991); patentes de los Estados Unidos N.º 5.573.920, 4.474.893, 5.601.819, 4.714.681, 4.925.648; 6.106.835; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992). En algunas realizaciones, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas son quiméricas. En determinadas realizaciones, las

composiciones relacionadas con inmunoglobulinas están humanizadas.

Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología adicionalmente se pueden fusionar de forma recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugarse químicamente (incluidas las conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología se pueden fusionar o conjugar de forma recombinante con moléculas útiles como marcas en ensayos de detección y a moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos o toxinas. Véanse, por ejemplo, WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patente de EE. UU. n.º 5.314.995; y documento EP 0 396 387.

En cualquiera de las realizaciones anteriores de las composiciones relacionadas con inmunoglobulina de la presente tecnología, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede estar opcionalmente conjugado con un agente seleccionado del grupo que consiste en isótopos, tintes, cromógenos, agentes de contraste, fármacos, toxinas, citocinas, enzimas, inhibidores enzimáticos, hormonas, antagonistas de hormonas, factores de crecimiento, radionucleidos, metales, liposomas, nanopartículas, ARN, ADN o cualesquiera combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente tecnología puede combinarse con un transportador farmacéuticamente aceptable. Para un enlace químico o un enlace físico, un grupo funcional de la composición relacionada con inmunoglobulina típicamente se asocia con un grupo funcional del agente. Como alternativa, un grupo funcional del agente se asocia con un grupo funcional de la composición relacionada con inmunoglobulina.

Los grupos funcionales del agente y la composición relacionada con inmunoglobulina se pueden asociar directamente. Por ejemplo, un grupo funcional (por ejemplo, un grupo sulfhidrilo) de un agente se puede asociar con un grupo funcional (por ejemplo, grupo sulfhidrilo) de una composición relacionada con inmunoglobulina para formar un disulfuro. Como alternativa, los grupos funcionales se pueden asociar mediante un agente de reticulación (es decir, un enlazador). Algunos ejemplos de agentes de reticulación se describen más adelante. El reticulador se puede unir tanto al agente como a la composición relacionada con inmunoglobulina. El número de agentes o composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de un conjugado también está limitada por el

número de grupos funcionales presentes en el otro. Por ejemplo, el número máximo de agentes asociada con un conjugado depende del número de grupos funcionales presentes en la composición relacionada con inmunoglobulina. Como alternativa, el número máximo de composiciones relacionadas con

5 inmunoglobulinas asociado con un agente depende del número de grupos funcionales presentes en el agente.

En otra realización más, el conjugado comprende una composición relacionada con inmunoglobulina asociada con un agente. En una realización, un conjugado comprende al menos un agente químicamente unido (por ejemplo,

10 conjugado) con al menos una composición relacionada con inmunoglobulina. El agente puede estar químicamente unido a una composición relacionada con inmunoglobulina por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un grupo funcional del agente puede estar directamente unido a un grupo funcional de la composición relacionada con inmunoglobulina. Algunos ejemplos de

15 grupos funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, amino, carboxilo, sulfhidrilo, maleimida, isocianato, isotiocianato e hidroxilo.

El agente también se puede unir químicamente a la composición relacionada con inmunoglobulina mediante agentes de reticulación, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas y similares. Los agentes de

20 reticulación, por ejemplo, se pueden obtener de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill. El sitio web de The Pierce Biotechnology, Inc. puede proporcionar ayuda. Agentes de reticulación adicionales incluyen los agentes de reticulación de platino descritos en las patentes de EE. UU. números 5.580.990; 5.985.566; y 6.133.038 de Kreatech Biotechnology, B.V., Ámsterdam, Países Bajos.

Como alternativa, el grupo funcional del agente y la composición relacionada con inmunoglobulina pueden ser iguales. Los reticuladores homobifuncionales se utilizan típicamente para reticular grupos funcionales idénticos. Los ejemplos de reticuladores homobifuncionales incluyen EGS (es

25 decir, bis[succinimidilsuccinato]de etilenglicol), DSS (es decir, suberato de disuccinimidilo), DMA (es decir, adipimidato de dimetilo·2HCl), DTSSP (es decir, 3,3'-ditiobis[propionato de sulfosuccinimidilo]), DPDPB (es decir, 1,4-di-[3'-(2'-

30 piridilditio)-propionamido]butano) y BMH (es decir, bis-maleimidohexano). Dichos reticuladores homobifuncionales también están disponibles de Pierce Biotechnology, Inc.

35 En otros casos, puede ser ventajoso escindir el agente de la composición

relacionada con inmunoglobulina. El sitio web de Pierce Biotechnology, Inc. anteriormente descrito también puede proporcionar asistencia al experto en la técnica para seleccionar reticuladores adecuados que se pueden escindir mediante, por ejemplo, las enzimas de la célula. Así, el agente se puede separar

5 de la composición relacionada con inmunoglobulina. Los ejemplos de enlazadores escindibles incluyen SMPT (es decir, 4-succinimidiloxycarbonil-metil-a-[2-piridilditio]tolueno), Sulfo-LC-SPDP (es decir, 6-(3-[2-piridiltio]-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo), LC-SPDP (es decir, 6-(3-[2-piridiltio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo), Sulfo-LC-SPDP (es decir, 6-

10 (3-[2-piridiltio]-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo), SPDP (es decir, 3-[2-piridiltio]-propionamidohexanoatode N-succinimidilo) y AEDP (es decir, clorhidrato del ácido 3-[(2-aminoetil)ditio]propiónico).

En otra realización, un conjugado comprende al menos un agente físicamente unido a al menos una composición relacionada con inmunoglobulina.

15 Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para unir físicamente los agentes con las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas. Por ejemplo, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas y los agentes se pueden mezclar entre sí por cualquier método conocido en la técnica. El orden de mezclado no es importante. Por ejemplo, los agentes pueden mezclarse con

20 las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas por cualquier método conocido de los expertos en la técnica. Por ejemplo, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas y los agentes se pueden introducir en un recipiente y agitarse, mediante, por ejemplo, agitando el recipiente, para mezclar las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas y los agentes.

25 Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas se pueden modificar por cualquier método conocido de los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición relacionada con inmunoglobulina se puede modificar mediante agentes de reticulación o grupos funcionales, como se ha descrito anteriormente.

30 A. Métodos para preparar los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología

Visión general. Inicialmente, se selecciona un polipéptido diana contra el que se puede establecer un anticuerpo de la presente tecnología. Por ejemplo, un anticuerpo puede sensibilizarse frente a la proteína DLL3 de longitud

35 completa, o a una parte del dominio extracelular de la proteína DLL3. La técnica

para generar anticuerpos dirigidas hacia dichos polipéptidos diana son bien conocidas de los expertos en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, las que implican bibliotecas de expresión, xenoratonas o ratones humanos, hibridomas y similares. Los polipéptidos diana comprendidos en el alcance de la presente tecnología incluyen cualquier polipéptido derivado de la proteína DLL3 que contenga el dominio extracelular que pueda suscitar una respuesta inmunitaria.

Se deberá entender que los anticuerpos diseñados mediante ingeniería genética de manera recombinante y los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, polipéptidos relacionados con anticuerpos, que se dirigen a la proteína DLL3 y fragmentos de los mismos son adecuados para usar de acuerdo con la presente divulgación.

Los anticuerpos dirigidos contra DLL3 que se pueden someter a las técnicas definidas en el presente documento incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, y fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, scFv, diacuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos, cadenas pesadas de anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo. Los métodos útiles para la producción de alto rendimiento de polipéptidos que contienen Fv de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo Fab' y F(ab')₂ ya se han descrito. Véase la patente de EE.UU. n.º 5.648.237.

En general, un anticuerpo se obtiene de una especie originaria. Más particularmente, se obtiene la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos de la porción variable de la cadena ligera, cadena pesada o ambos, de un anticuerpo de una especie originaria que tiene especificidad por un antígeno polipeptídico diana. Una especie originaria es cualquier especie que es útil para generar el anticuerpo de la presente tecnología o biblioteca de anticuerpos, por ejemplo, rata, ratón, conejo, pollo, de mono, ser humano y similares.

Las tecnologías de expresión en fago o fagémido son técnicas útiles para derivar los anticuerpos de la presente tecnología. Las técnicas para generar y clonar anticuerpos monoclonales son bien conocidas por los expertos en la técnica. La expresión de secuencias que codifican anticuerpos de la presente tecnología, se puede realizar en *E. coli*.

Debido a la degeneración de las secuencias que codifican ácidos nucleicos, otras secuencias que codifican sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos que las de las proteínas naturales se pueden usar

en la práctica de la presente tecnología. Estas incluyen, aunque no de forma limitativa, secuencias de ácidos nucleicos que incluyen todo o partes de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos anteriores, que se han alterado mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un

5 restos de aminoácido funcionalmente equivalente dentro de la secuencia, produciendo así un cambio silencioso. Se aprecia que la secuencia de nucleótidos de una inmunoglobulina de acuerdo con la presente tecnología tolera variaciones de homología de secuencia de hasta un 25 % según se calcula por los métodos habituales ("Current Methods in Sequence Comparison and

10 Analysis", *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, págs. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.) siempre que dicha variante forme un anticuerpo operativo que reconozca las proteínas DLL3. Por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos dentro de la una secuencia del polipéptido se pueden sustituir por otro aminoácido de polaridad similar que actúa como un

15 equivalente funcional, lo que resulta en una alteración silenciosa. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares

20 incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen dentro del alcance de la presente tecnología proteínas o fragmentos o derivados de la misma que se

25 pueden modificar diferencialmente durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante glucosilación, escisión proteolítica, unión con una molécula de anticuerpo u otros ligandos celulares, etc. Adicionalmente, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una inmunoglobulina se puede mutar *in vitro* o *in vivo* para crear y/o destruir las secuencias de traducción, iniciación y/o

30 terminación o para crear variaciones en las regiones codificantes y/o forman nuevos sitios de endonucleasa de restricción o destruir los ya existentes, para facilitar aún más la modificación *in vitro*. Se puede usar cualquier técnica de mutagénesis conocida en la técnica, incluida, aunque no de forma limitativa, mutagénesis dirigida a sitio *in vitro*, *J. Biol. Chem.* 253:6551, uso de enlazadores

35 Tab (Pharmacia), y similares.

Preparación de antisuero policlonal e inmunógenos. Los métodos para generar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente tecnología incluyen típicamente inmunizar un sujeto (generalmente un sujeto no humano como un ratón o un conejo) con una proteína DLL3 purificada o fragmento de la misma o con una célula que expresa la proteína DLL3 o fragmento de la misma. Una preparación inmunógena adecuada puede contener, por ejemplo, una proteína DLL3 expresada de forma recombinante o un péptido de DLL3 sintetizado químicamente. El dominio extracelular de la proteína DLL3, o porción o fragmento de la misma, se puede usar como inmunógeno para generar un anticuerpo dirigido contra DLL3 que se une a la proteína DLL3, o porción o fragmento de la misma usando técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales.

La proteína DLL3 de longitud completa, o fragmentos de la misma, son de utilidad como fragmentos de inmunógenos. En algunas realizaciones, un fragmento de DLL3 comprende el dominio extracelular de DLL3 de tal manera que un anticuerpo sensibilizado contra el péptido forma un inmunocomplejo específico con la proteína DLL3.

El dominio extracelular de DLL3 tiene 466 aminoácidos de longitud, extendiéndose entre los aminoácidos 27-492 de la proteína DLL3 de longitud completa. En algunas realizaciones, el péptido DLL3 antigénico comprende al menos 5, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 restos de aminoácidos. A veces son deseables péptidos antigénicos más largos en comparación con los péptidos antigénicos más cortos, dependiendo del uso y de acuerdo con métodos bien conocidos del experto en la técnica. Los multímeros de un epítipo dado a veces son más eficaces que un monómero.

Si fuese necesario, la inmunogenicidad de la proteína DLL3 (o fragmentos de la misma) se puede aumentar mediante fusión o conjugación con una proteína transportadora tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) u ovoalbúmina (OVA). Se conocen en la técnica muchas de dichas proteínas transportadoras. La proteína DLL3 también se puede combinar con un adyuvante convencional tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund para aumentar la reacción inmunitaria del sujeto contra el polipéptido. Diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria incluyen, aunque no de forma limitativa, Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de

aluminio), sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, dinitrofenol, etc.), adyuvantes humanos tal como el bacilo de Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*, o compuestos inmunoestimuladores similares. Estas técnicas son habituales en la técnica.

Al describir la presente tecnología, las respuestas inmunitarias se pueden describir como respuestas inmunitarias "primarias" o "secundarias". Una respuesta inmunitaria primaria, que también se describe como una respuesta inmunitaria "protectora", se refiere a una respuesta inmunitaria producida en un individuo como resultado de alguna exposición inicial (por ejemplo, la "inmunización" inicial) a un antígeno en particular, por ejemplo, la proteína DLL3. En algunas realizaciones, la inmunización se puede producir como resultado de la vacunación del individuo con una vacuna que contiene el antígeno. Por ejemplo, la vacuna puede ser una vacuna de DLL3 que comprende uno o más antígenos derivados de la proteína DLL3. Una respuesta inmunitaria primaria puede debilitarse o atenuarse con el tiempo y puede incluso desaparecer o al menos quedar tan atenuada que no se pueda detectar. Por consiguiente, la presente tecnología también se refiere a una respuesta inmunitaria "secundaria", que también se describe en este punto como una "respuesta inmunitaria de memoria". El término respuesta inmunitaria secundaria se refiere a una respuesta inmunitaria estimulada en un individuo después que se ha producido ya una respuesta inmunitaria primaria.

Por tanto, se puede generar una respuesta inmunitaria secundaria, por ejemplo, para potenciar una respuesta inmunitaria existente que se ha debilitado o atenuado, o para recrear una respuesta inmunitaria anterior que bien ha desaparecido o que ya no se puede detectar. La respuesta inmunitaria secundaria o con memoria puede ser tanto una respuesta humoral (anticuerpo) como una respuesta celular. Se produce una respuesta humoral secundaria o con memoria tras la estimulación de los linfocitos B con memoria que se generaron en la primera presentación del antígeno. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) son un tipo de respuesta inmunitaria secundaria o con memoria celular que están mediadas por linfocitos CD4⁺. Una primera exposición a un antígeno da como resultado el cebado del sistema inmunitario y una exposición(ones) adicionales en una DTH.

Después de la inmunización adecuada, el anticuerpo dirigido contra DLL3

se puede preparar a partir del suero del sujeto. Si se desea, las moléculas del anticuerpo dirigido contra la proteína DLL3 se pueden aislar de los mamíferos (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de polipéptido A para obtener la fracción de IgG.

Anticuerpo monoclonal. En una realización de la presente tecnología, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal dirigido contra DLL3. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal dirigido contra DLL3 puede ser un anticuerpo monoclonal dirigido contra DLL3 humano o de ratón. Para la preparación de los anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína DLL3, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante cultivos continuos de líneas celulares. Dichas técnicas incluyen, aunque no de forma limitativa, la técnica del hibridoma (véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975. *Nature* 256: 495-497); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (véase, por ejemplo, Kozbor, *et al.*, 1983. *Immunol. Today* 4: 72) y la técnica del hibridoma del VEB para producir anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, Cole, *et al.*, 1985. En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden utilizar en la práctica de la presente tecnología y se pueden producir usando hibridomas humanos (véase, por ejemplo, Cote, *et al.*, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030) o mediante la transformación de linfocitos B humanos con el virus de Epstein Barr *in vitro* (véanse, por ejemplo, Cole, *et al.*, 1985. En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Por ejemplo, se puede aislar una población de ácidos nucleicos que codifican regiones de anticuerpos. Se utiliza PCR con cebadores derivados de secuencias que codifican regiones conservadas de los anticuerpos para amplificar secuencias que codifican porciones de anticuerpos derivadas de la población y, a continuación, los ADN que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos, tales como los dominios variables, se reconstruyen a partir de las secuencias amplificadas. Dichas secuencias amplificadas también se pueden fusionar con los ADN que codifican otras proteínas, –por ejemplo, una cubierta de bacteriófago o una proteína de la superficie de una bacteria – para expresión y presentación de los polipéptidos de fusión sobre el fago o la bacteria. A

continuación, las secuencias amplificadas se pueden expresar y seleccionarse o aislarse adicionalmente según, por ejemplo, la afinidad del anticuerpo o fragmento del mismo expresado por un antígeno o epítipo presente en la proteína DLL3. Como alternativa, los hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales contra DLL3 se pueden generar inmunizando un sujeto y aislando a continuación hibridomas del bazo del sujeto utilizando métodos rutinarios. Véanse, por ejemplo, Milstein *et al.*, (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* (1981) 73: 3-46). El cribado de hibridomas usando métodos convencionales producirá anticuerpos monoclonales de especificidad (es decir, para diferentes epítopos) y afinidad variables. Un anticuerpo monoclonal seleccionado con las propiedades deseadas, por ejemplo, unión a DLL3, se puede usar expresado mediante el hibridoma, se puede unir a una molécula como polietilenglicol (PEG) para alterar sus propiedades, o bien el ADNc que lo codifica se puede aislar, secuenciar y manipular de diversas formas. Se pueden agregar árboles dendroméricos a las cadenas laterales de aminoácidos reactivos, por ejemplo, lisina, para potenciar las propiedades inmunógenas de la proteína DLL3. Además, se pueden usar técnicas de CPG-dinucleótido para potenciar la propiedades inmunógenas de la proteína DLL3. Otras manipulaciones incluyen sustituir o eliminar restos de acilo en aminoácidos concretos que pueden contribuir a la inestabilidad del anticuerpo durante el almacenamiento o después de la administración a un sujeto, y técnicas de afinación por maduración para mejorar la afinidad del anticuerpo por la proteína DLL3.

Técnica del hibridoma. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente tecnología es un anticuerpo monoclonal dirigido contra DLL3 producido por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanas fusionados a una célula inmortalizada. Las técnicas del hibridoma incluyen aquellas conocidos en la técnica y enseñadas en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988); Hammerling *et al.*, *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981). Otros métodos para producir hibridomas y anticuerpos monoclonales son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Técnica de expresión en fago. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos de la presente tecnología se pueden producir mediante la aplicación

de tecnología de ADN recombinante y expresión en fago. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos dirigidos contra DLL3 usando varios métodos de expresión en fago conocidos en la técnica. En los métodos de expresión en fago, los dominios funcionales del anticuerpo se presentan en la superficie de las partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican.

5 Los fagos que tienen la propiedad de unión deseada se seleccionan entre una gama o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, de ser humano o murino) por selección directa mediante antígeno, típicamente un antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos

10 son típicamente fagos filamentosos entre los que se incluyen fd y M13 con Fab, Fv o dominios de anticuerpo Fv estabilizados con disulfuro que se fusionan de forma recombinante bien con el gen III de fago o la proteína del gen VIII. Además, los métodos se puede adaptar para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, por ejemplo, Huse, *et al.*, *Science* 246: 1275-1281, 1989) para

15 permitir una identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido de DLL3, por ejemplo, un polipeptídico o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Otros ejemplos de métodos de expresión en fago que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente tecnología incluyen los descritos en

20 Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 85: 5879-5883, 1988; Chaudhary *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 87: 1066-1070, 1990; 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;

25 documento PCT /GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO 96/06213; WO 92/01047 (Medical Research Council *et al.*); WO 97/08320 (Morphosys); WO 92/01047 (CAT/MRC); WO 91/17271 (Affymax); y las patentes de EE. UU. números 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753,

30 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727 y 5.733.743. Los métodos útiles para expresar péptidos sobre la superficie de las partículas de bacteriófagos mediante la unión de polipéptidos descritos con puentes disulfuro se ha descrito en Lohning, patente de EE. UU. n.º 6.753.136. Como se ha descrito en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las

35 regiones codificantes del anticuerpo en el fago se pueden aislar y utilizar para

generar anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado que incluye células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias. Por ejemplo, las técnicas para producir de forma recombinante Fab, Fab' y fragmentos F(ab')₂ también se pueden utilizar usando métodos conocidos en la técnica tales como los divulgados en el documento WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12: 864-869, 1992; y Sawai *et al.*, *AJRI* 34: 26-34, 1995; y Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043, 1988.

En general, los anticuerpos híbridos o los fragmentos de anticuerpos híbridos que se clonan en un vector de expresión se pueden seleccionar contra el antígeno adecuado para identificar variantes que mantienen buena actividad de unión, puesto que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo estará presente sobre la superficie del fago o partícula de fagémido. Véanse, por ejemplo, Barbas III *et al.*, *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). Sin embargo, se podrían usar en este proceso otros formatos vectoriales, tales como la clonación de la biblioteca de fragmentos de anticuerpo en un vector de fago lítico (sistemas T7 modificados o Lambda Zap) para selección y/o cribado.

Expresión de anticuerpos recombinantes contra DLL3. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos de la presente tecnología se pueden producir mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante. Las construcciones de polinucleótidos recombinantes que codifican un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología incluyen una secuencia de control de la expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de las cadenas del anticuerpo dirigido contra DLL3, incluyendo regiones promotoras asociadas de manera natural o heterólogas. De este modo, otro aspecto de la tecnología incluye vectores que contienen una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología. Para la expresión recombinante de uno o más de los polipéptidos de la presente tecnología, el ácido nucleico que contiene todo o parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo dirigido contra DLL3 se introduce en un vector de clonación adecuado, o en un vector de expresión (es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica el polipéptido introducida) mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica y detalladas a

continuación. Los métodos para producir diversas poblaciones de vectores se han descrito en Lerner *et al.*, patentes de EE. UU. números 6.291.160 y 6.680.192.

5 En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente divulgación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la presente tecnología pretende incluir algunas otras formas de vectores de expresión que no son técnicamente plásmidos, tales como vectores víricos (por
10 ejemplo, retrovirus defectuosos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes. Dichos vectores víricos permiten la infección de un sujeto y la expresión de una construcción en dicho sujeto. En algunas realizaciones, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o
15 transfectar células hospedadoras eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado al hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo anti-DLL3, y la recogida y purificación del anticuerpo anti-DLL3, por ejemplo, anticuerpos que reaccionan de forma cruzada
20 con DLL3. Véanse, en general, el documento U.S. 2002/0199213. Estos vectores de expresión se pueden replicar de forma típica en los organismos hospedadores, ya sea como episomas o como parte íntegra del ADN cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a la ampicilina o
25 resistencia a la higromicina, para permitir la detección de dichas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas. Los vectores también pueden codificar un péptido de señalización, por ejemplo, pectato liasa, útiles para dirigir la secreción extracelular de fragmentos de anticuerpo. Véase la patente de EE.UU. n.º 5.576.195.

30 Los vectores de expresión recombinantes de la presente tecnología comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína con propiedades de unión a DLL3 en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas
35 según las células hospedadoras a utilizar para la expresión que están

operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, operativamente unido" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés se une a la una o más secuencias reguladoras de modo que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*) o en una célula hospedadora cuando se introduce el vector en la célula hospedadora). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en determinadas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se vaya a transformar, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Las secuencias reguladoras típicas útiles como promotores de la expresión del polipéptido recombinante (por ejemplo, anticuerpo dirigido contra DLL3), incluyen, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores inducibles en levaduras incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. En una realización, un polinucleótido que codifica un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología está unido operativamente a un promotor *ara B* y se puede expresar en una célula hospedadora. Véase la patente de EE.UU. n.º 5.028.530. Los vectores de expresión de la presente tecnología se pueden introducir en células hospedadoras para de este modo producir polipéptidos o péptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra DLL3, etc.).

Otro aspecto de la presente tecnología se refiere a las células hospedadoras que expresan anticuerpos dirigidos contra DLL3, que contienen un ácido nucleico que codifica uno o más anticuerpos dirigidos contra DLL3. Los

vectores de expresión recombinante de la presente tecnología se pueden diseñar para la expresión de un anticuerpo dirigido contra DLL3 en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra DLL3 se puede expresar en células bacterianas como *Escherichia coli*, en células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus), células fúngicas, por ejemplo, levadura, células de levadura o células de mamífero. Las células hospedadoras adecuadas se analizan más a fondo en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Como alternativa, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo, utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7. Los métodos útiles para la preparación y cribado de los polipéptidos que tienen una propiedad predeterminada, por ejemplo, anticuerpo anti-DLL3, mediante la expresión de secuencias de polinucleótidos generadas aleatoriamente que se han descrito anteriormente. Véanse las patentes de EE. UU. números 5.763.192; 5.723.323; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5.976.862; 6.492.107; 6569641.

La expresión de polipéptidos en procariotas se realiza con mayor frecuencia en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, por lo general al extremo amino o carboxilo del polipéptido recombinante. Dichos vectores de fusión suelen servir para tres fines: (i) aumentar la expresión del polipéptido recombinante; (ii) aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y (iii) ayudar en la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. Con frecuencia, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante del resto de fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el factor Xa, la trombina y la enteroquinasa. Los ejemplos típicos de vectores de expresión de fusión incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson, 1988. *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), polipéptido E de unión a maltosa o polipéptido A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann *et al.*, (1988) *Gene* 69: 301-315) y pET 11d (Studier *et al.*, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). Los métodos para dirigir el montaje de distintos dominios de péptido o proteína activos para obtener polipéptidos multifuncionales mediante fusión de polipéptidos se han descrito en Pack *et al.*, las patentes de EE.UU. números 6.294.353; 6692935. Una estrategia para maximizar la expresión del polipéptido recombinante, por ejemplo, un anticuerpo anti-DLL3, en *E. coli* es expresar el polipéptido en una bacteria hospedadora con una capacidad deteriorada para escindir proteolíticamente el polipéptido recombinante. Véase, por ejemplo, Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico a introducir en un vector de expresión de modo que los codones individuales de cada aminoácido sea aquellos preferentemente utilizados en el hospedador de expresión, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo, Wada, *et al.*, 1992. *Nucl. Acids Res.* 20: 2111-2118). Dicha alteración de secuencias de ácidos nucleicos de la presente tecnología se puede llevar a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN normalizadas.

En otra realización, el vector de expresión del anticuerpo dirigido contra DLL3 es un vector de expresión en levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, *et al.*, 1987. *EMBO J.* 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, *Cell* 30: 933-943, 1982), pJRY88 (Schultz *et al.*, *Gene* 54: 113-123, 1987), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.). Como alternativa, un anticuerpo dirigido contra DLL3 se puede expresar en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de polipéptidos, por ejemplo, anticuerpo anti-DLL3, en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie pAc (Smith, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165, 1983) y la serie pVL (Lucklow y Summers, 1989. *Virology* 170: 31-39).

En otra realización más, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores

de expresión de mamífero incluyen, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, pCDM8 (Seed, *Nature* 329: 840, 1987) y pMT2PC (Kaufman, *et al.*, *EMBO J.* 6: 187-195, 1987). Cuando se usan en células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión son proporcionadas frecuentemente por

5 elementos reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente derivan de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas de utilidad para la expresión del anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología, véanse, por ejemplo, los capítulos 16 y 17 de Sambrook, *et al.*,

10 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

En otra realización, el vector de expresión de mamíferos recombinante puede dirigir la expresión del ácido nucleico en un tipo de célula particular (por

15 ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert, *et al.*, *Genes Dev.* 1: 268-277, 1987), promotores específicos linfocitos (Calame y Eaton, *Adv. Immunol.* 43: 235-275,

20 1988), promotores de receptores de linfocitos T (Winoto y Baltimore, *EMBO J.* 8: 729-733, 1989) e inmunoglobulinas (Banerji, *et al.*, 1983. *Cell* 33: 729-740; Queen y Baltimore, *Cell* 33: 741-748, 1983.), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamento; Byrne y Ruddle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477, 1989), promotores específicos del páncreas

25 (Edlund, *et al.*, 1985. *Science* 230: 912-916), y promotores específicos de glándula mamaria (por ejemplo, promotor de suero de leche); patente de EE. UU. n.º 4.873.316 y patente de EE. UU. N.º 264.166). También se incluyen los promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo, los promotores de hox de murino (Kessel y Gruss, *Science* 249: 374-379, 1990) y el promotor de α -fetoproteína (Campes y Tilghman, *Genes Dev.* 3: 537-546, 1989).

30

Otro aspecto de la presente tecnología se refiere a las células hospedadoras en las que ha introducido un vector de expresión recombinante de la presente tecnología. Las expresiones "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se utilizan indistintamente en el presente

35 documento. Se entiende que dichos términos no solo se refieren a la célula sujeto

en particular, sino también a la descendencia o posible descendencia de dicha célula. Como pueden producirse determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, ser idéntica a la célula original, pero sigue estando incluida en el alcance de la expresión tal como se usa en el presente documento.

Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra DLL3 se puede expresar en células bacterianas como *E. coli*, células de insecto, células de levadura o de mamífero.

Las células de mamífero son un hospedador adecuado para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes To Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). En la técnica se han desarrollado varias líneas celulares hospedadoras adecuadas que pueden secretar proteínas heterólogas intactas e incluyen líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), diversas líneas de células COS, células HeLa, células L y líneas de células de mieloma. En algunas realizaciones, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador y los necesarios sitios de procesamiento de la información, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89: 49, 1986. Las secuencias de control de la expresión ilustrativas son promotores procedentes de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino y similares. Co *et al.*, *J Immunol.* 148: 1149, 1992. Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas por los expertos en la materia.

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas por técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se utiliza en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden indicar diversas técnicas reconocidas por la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora, incluidas la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, biolística o transfección basada en virus. Otros métodos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y

microinyección (véase, de forma general, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*). Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras en Sambrook, *et al.* (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y otros manuales de laboratorio. Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés se pueden transferir a la célula hospedadora por métodos bien conocidos, dependiendo del tipo de hospedador celular.

Para la transfección estable en células de mamífero, se sabe que, según el vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, solo una pequeña fracción de las células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se puede introducir un gen que codifique un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Diversos marcadores seleccionables incluyen los que transmiten resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Los ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable pueden introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica anticuerpo dirigido contra DLL3 o se pueden introducir en un vector independiente. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido se pueden identificar mediante selección con fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Una célula hospedadora que incluye un anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología, tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, se puede usar para producir (es decir, expresar) el anticuerpo recombinantes contra DLL3. En una realización, el método comprende cultivar la célula hospedadora (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifican el anticuerpo dirigido contra DLL3) en un medio adecuado de modo que se produce el anticuerpo dirigido contra DLL3. En otra realización, el método comprende además la etapa de aislar el anticuerpo dirigido contra DLL3 del medio o la célula hospedadora. Una vez expresados, las colecciones de anticuerpo dirigido contra DLL3, por ejemplo, los anticuerpos anti-DLL3 o los polipéptidos relacionados con el anticuerpo dirigido contra DLL3 se purifican del medio de cultivo y las células hospedadoras. El anticuerpo dirigido contra DLL3 se puede purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la

técnica, incluyendo la purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. En una realización, el anticuerpo dirigido contra DLL3 se produce en un organismo hospedador por el método de Boss *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.816.397. Normalmente, las cadenas del anticuerpo dirigido contra DLL3 se expresan con secuencias de señalización y de este modo se liberan al medio de cultivo. Sin embargo, si las cadenas del anticuerpo dirigido contra DLL3 no se secretan desde las células hospedadoras de forma natural, las cadenas del anticuerpo dirigido contra DLL3 se pueden liberar por tratamiento con un detergente suave. La purificación de polipéptidos recombinantes es bien conocida en la técnica e incluye precipitación con sulfato de amonio, la técnica de purificación por cromatografía de afinidad, cromatografía en columna, la técnica de purificación por intercambio iónico, electroforesis en gel y similares (véanse, en general, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Los polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-DLL3, por ejemplo, las secuencias que codifican anticuerpos dirigidos contra DLL3, se pueden incorporar a transgenes para su introducción en el genoma de un animal transgénico y su posterior expresión en la leche del animal transgénico. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. números 5.741.957, 5.304.489 y 5.849.992. Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en unión operativa con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tales como la caseína o β -lactoglobulina. Para la producción de animales transgénicos, pueden microinyectarse los transgenes en ovocitos fertilizados o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias y se transfieren los núcleos de dichas células a ovocitos desnucleados.

Anticuerpos monocatenarios. En una realización, el anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología es un anticuerpo dirigido contra DLL3 monocatenario. De acuerdo con la presente tecnología, pueden adaptarse las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos a una proteína DLL3 (véase, por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 4.946.778). Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fvs monocatenarios y anticuerpos de la presente tecnología incluyen los descritos en las patentes de EE. UU. números 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology*, 203: 46-88, 1991; Shu, L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999, 1993; y Skerra *et al.*, *Science* 240: 1038-1040, 1988.

Anticuerpos quiméricos y humanizados. En una realización, el anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología es un anticuerpo dirigido contra DLL3 quimérico. En una realización, el anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología es un anticuerpo dirigido contra DLL3 humanizado. En una realización de la presente tecnología, los anticuerpos donante y aceptor son anticuerpos monoclonales de diferentes especies. Por ejemplo, el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano (para minimizar su antigenicidad en un ser humano), en cuyo caso, el anticuerpo injertado con CDR resultante se denomina anticuerpo "humanizado".

Los anticuerpos anti-DLL3 recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, se pueden fabricar usando técnicas convencionales de ADN recombinante, y están comprendidas en el alcance de la presente tecnología. Para algunos usos, que incluyendo el uso *in vivo* del anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología en seres humanos así como el uso de estos agentes en ensayos de detección *in vitro*, es posible utilizar anticuerpos anti-DLL3 quiméricos o humanizados. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Dichos métodos útiles incluyen, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los métodos descritos en la solicitud internacional n.º PCT/US86/02269; patente de EE. UU. n.º 5.225.539; patente europea n.º 184187; patente europea n.º 171496; patente europea n.º 173494; publicación internacional n.º WO 86/01533; las patentes de EE.UU. números 4.816.567; 5.225.539; patente europea n.º 125023; Better, *et al.*, 1988. *Science* 240: 1041-1043; Liu, *et al.*, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu, *et al.*, 1987. *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun, *et al.*, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218; Nishimura, *et al.*, 1987. *Cancer Res.* 47: 999-1005; Wood, *et al.*, 1985. *Nature* 314: 446-449; Shaw, *et al.*, 1988. *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi, *et al.* (1986) *BioTechniques* 4: 214; Jones, *et al.*, 1986. *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan, *et al.*, 1988. *Science* 239: 1534; Morrison, *Science* 229: 1202, 1985; Oi *et al.*, *BioTechniques* 4: 214, 1986; Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202, 1989; patente de EE. UU. n.º 5.807.715; y Beidler, *et al.*, 1988. *J. Immunol.* 141: 4053-4060. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden humanizar usando una diversidad de técnicas que incluyen el injerto de CDR (documento EP 0 239 400; WO

91/09967; patente de EE. UU. n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.859.205; 6.248.516; EP460167), inactivación superficial o acondicionamiento de la superficie del gen (documentos EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., *Molecular Immunology*, 28: 489-498, 1991; Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7: 805-814, 1994; Roguska *et al.*, *PNAS* 91: 969-973 (1994)) y transposición de cadenas (patente de EE. UU. n.º 5.565.332). En una realización, un ADNc que codifica un anticuerpo monoclonal dirigido contra DLL3 de murino se digiere con una enzima de restricción específicamente seleccionada para eliminar la secuencia que codifica la región constante Fc, y se sustituye la porción equivalente de un ADNc que codifica una región constante Fc humana (véanse Robinson *et al.*, documento PCT /US86/02269; Akira *et al.*, solicitud de patente europea 184187; Taniguchi, solicitud de patente europea 171496; Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173494; Neuberger *et al.*, WO 86/01533; Studnicka *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea 125023; Better *et al.* (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J Immunol* 139: 3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res* 47: 999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314: 446-449; y Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; patente de EE. UU. n.º 6.180.370; las patentes de EE.UU. números 6.300.064; 6.696.248; 6.706.484; 6.828.422.

En una realización, la presente tecnología proporciona la construcción de anticuerpos dirigidos contra DLL3 humanizados que improbablemente dan como resultado la inducción de una respuesta del anticuerpo humano contra el de ratón (denominado a partir de ahora en el presente documento como "HAMA"), aunque manteniendo una función efectora de anticuerpo eficaz. Como se utiliza en el presente documento, los términos "humano" y "humanizado", respecto de los anticuerpos, se refieren a cualquier anticuerpo del que se espera que suscite una respuesta inmunógena débil tolerable en un sujeto humano. En una realización, la presente tecnología proporciona anticuerpos anti-DLL3 humanizados, inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada.

Anticuerpos CDR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología es un anticuerpo CDR dirigido contra DLL3. Generalmente, los anticuerpos donantes y aceptores usados para generar el anticuerpo CDR dirigido contra DLL3 son anticuerpos monoclonales de diferentes especies; normalmente, el anticuerpo aceptor es un anticuerpo

humano (para minimizar su antigenicidad en un ser humano), en cuyo caso, el anticuerpo injertado con CDR resultante se denomina anticuerpo "humanizado". El injerto puede ser de una única CDR (o incluso una parte de una única CDR) dentro de una única V_H o V_L del anticuerpo aceptor, o puede ser de múltiples CDR (o partes de las mismas) dentro de una o ambas V_H y V_L . Con frecuencia, las CDR en todos los dominios variables del anticuerpo aceptor se sustituirá con las CDR donantes correspondientes, aunque se necesite sustituir solo como mucho según sea necesario para permitir una unión adecuada del anticuerpo injertado con la CDR resultante a una proteína DLL3. Los métodos para generar anticuerpos injertados con CDR y anticuerpos humanizados se enseñan por Queen *et al.* patente de EE.UU. n.º 5.585.089; patente de EE. UU. n.º 5.693.761; patente de EE. UU. n.º 5.693.762; y Winter, documento 5.225.539; y documento EP 0682040. Los métodos útiles para preparar los polipéptidos de V_H y V_L se enseñan por Winter *et al.*, las patentes de EE.UU. números 4.816.397; 6.291.158; 6.291.159; 6.291.161; 6.545.142; los documentos EP 0368684; EP0451216; y EP0120694.

Tras seleccionar los candidatos de la región marco adecuada entre la misma familia y/o el mismo miembro de la familia, cualquiera o ambas de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se producen injertando las CDR de las especies originarias en las regiones marco híbridas. El ensamblaje de anticuerpos híbridos o de fragmentos de anticuerpos híbridos que tienen regiones de cadena variable híbridas con respecto a cualquiera de los anteriores aspectos se puede llevar a cabo usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican los dominios variables híbridos descritos en el presente documento (es decir, los marcos basados en las especies diana y las CDR de las especies originarias) pueden producirse mediante síntesis de oligonucleótido y/o PCR. Los ácidos nucleicos que codifican las regiones de las CDR se pueden aislar también de los anticuerpos de las especies originarias usando enzimas de restricción adecuadas y ligarse en el marco de las especies diana mediante ligadura con las enzimas de ligadura adecuadas. Como alternativa, las regiones marco de las cadenas variables del anticuerpo de la especie originaria puede cambiarse mediante mutagénesis dirigida a sitio.

Debido a que los híbridos se construyen a partir de elecciones entre múltiples candidatos que corresponden a cada región marco, existen muchas

combinaciones de secuencias que son adecuadas para la construcción de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. Por consiguiente, se pueden ensamblar bibliotecas de híbridos que tienen miembros con diferentes combinaciones de regiones marco individuales. Dichas bibliotecas pueden ser colecciones de secuencias de bases de datos electrónicas de secuencias de colecciones físicas de híbridos.

Este proceso no altera normalmente las FR del anticuerpo aceptor que flanquean las CDR injertadas. Sin embargo, un experto en la materia puede mejorar algo la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo injertado con CDR dirigido contra DLL3 resultante sustituyendo determinados restos de una FR dada para hacer la FR más similar a la FR correspondiente del anticuerpo donante. Las localizaciones adecuadas de las sustituciones incluyen restos de aminoácidos adyacentes a la CDR, o que son capaces de interactuar con una CDR (Véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089, especialmente las columnas 12-16). O un experto en la materia puede comenzar con la FR donante y modificar esta para ser más similar a la FR aceptora o una FR de consenso humana. Se conocen en la materia las técnicas para realizar estas modificaciones. Particularmente si la FR resultante se ajusta a una FR de consenso para esta posición, o es al menos un 90 % o más idéntica a dicha FR de consenso, hacerlo no puede aumentar significativamente la antigenicidad del anticuerpo injertado con la CDR dirigido contra DLL3 modificado resultante en comparación con el mismo anticuerpo con una FR completamente humana.

Anticuerpos biespecíficos (BsAb). Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que se puede unir simultáneamente a dos dianas que tienen una estructura distinta, por ejemplo, dos antígenos diana diferentes, dos epítomos diferentes en el mismo antígeno diana. Los BsAb pueden prepararse, por ejemplo, combinando cadenas pesadas y/o cadenas ligeras que reconocen diferentes epítomos del mismo o diferente antígeno. En algunas realizaciones, mediante la función molecular, un agente de unión biespecífico se une a un antígeno (o epítomo) en uno de sus dos brazos de unión (un par VH/VL), y se une a un antígeno diferente (o epítomo) en su segundo brazo (un par VH/VL diferente). Mediante esta definición, un agente de unión biespecífico tiene dos brazos de unión a antígeno distintos (tanto en la especificidad como en las secuencias de las CDR), y es monovalente para cada antígeno al cual se une.

Los anticuerpos biespecíficos (BsAb) y los fragmentos de anticuerpos

biespecíficos (BsFab) de la presente tecnología tienen al menos un brazo que se une específicamente a, por ejemplo, DLL3 y al menos otro brazo que se une específicamente a un segundo antígeno diana. En determinadas realizaciones, los BsAb pueden unirse a células tumorales que expresan el antígeno de DLL3 sobre la superficie celular.

Se puede producir una variedad de proteínas de fusión biespecíficas usando ingeniería molecular. Por ejemplo, Se han construido BsAb que utilizan tanto el marco completo de la inmunoglobulina (por ejemplo, IgG), un único fragmento de cadena variable (scFv), o las combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la proteína de fusión biespecífica es divalente, comprendiendo, por ejemplo, un scFv con un único sitio de unión para un antígeno y un fragmento Fab con un único sitio de unión para un segundo antígeno. En algunas realizaciones, la proteína de fusión biespecífica es divalente, comprendiendo, por ejemplo, un scFv con un único sitio de unión para un antígeno y otros fragmento scFv con un único sitio de unión para un segundo antígeno. En otras realizaciones, la proteína de fusión biespecífica es tetravalente, comprendiendo, por ejemplo, una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG) con dos sitios de unión para un antígeno y dos scFv idénticos para un segundo antígeno. Los BsAb compuestos por dos unidades scFv en tándem han mostrado ser un formato de anticuerpo biespecífico clínicamente satisfactorio. En algunas realizaciones, Se han diseñado BsAb que comprenden dos únicos fragmentos de cadena variable (scFv) en tándem de tal manera que un scFv que se une a un antígeno tumoral (por ejemplo, DLL3) se une con un scFv que se une a un antígeno diana diferente.

Recientes métodos para producir los BsAb incluyen anticuerpos monoclonales recombinantes diseñados mediante ingeniería genética que tienen restos de cisteína adicionales de tal manera que se reticulan más fuertemente que los isotipos de inmunoglobulina más comunes. Véanse, por ejemplo, FitzGerald *et al.*, *Protein Eng.* 10(10):1221-1225 (1997). Otra estrategia es diseñar mediante ingeniería genética proteínas de fusión recombinantes que se unen a dos o más anticuerpos o segmentos de fragmentos de anticuerpos monocatenarios con las especificidades dobles necesarias. Véanse, por ejemplo, Coloma *et al.*, *Nature Biotech.* 15:159-163 (1997). Se puede producir una variedad de proteínas de fusión biespecíficas usando ingeniería molecular.

Las proteínas de fusión biespecíficas que se unen a dos o más

anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monocatenarios diferentes se producen de una manera similar. Se pueden usar métodos recombinantes para producir una variedad de proteínas de fusión. En algunas realizaciones determinadas, un BsAb de acuerdo con la presente tecnología comprende una inmunoglobulina, cuya inmunoglobulina comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y un scFv. En algunas realizaciones determinadas, el scFv se une al extremo C de la cadena pesada de cualquier inmunoglobulina dirigida contra DLL3 divulgada en el presente documento. En algunas realizaciones determinadas, los scFv se unen al extremo C de la cadena ligera de cualquier inmunoglobulina dirigida contra DLL3 divulgada en el presente documento. En diversas realizaciones, los scFv se unen a las cadenas pesadas o ligeras *mediante* una secuencia enlazadora. Las secuencias enlazadoras adecuadas necesarias para la conexión en marco de la cadena pesada Fd al scFv se introducen en los dominios de V_L y V_{κ} mediante reacciones de la PCR. El fragmento de ADN que codifica el scFv se une a continuación en un vector de estadificación que contiene una secuencia de ADN que codifica el dominio CH1. La construcción scFv-CH1 resultante se escinde y se une en un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica la región V_H de un anticuerpo contra DLL3. El vector resultante se puede usar para transfectar una célula hospedadora adecuada, tal como una célula de mamífero para la expresión de la proteína de fusión biespecífica.

En algunas realizaciones, un enlazador tiene al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, un enlazador se caracteriza por que tiende a no adoptar una estructura tridimensional rígida, sino más bien proporciona flexibilidad al polipéptido (por ejemplo, primer y/o segundo sitio de unión a antígeno). En algunas realizaciones, un enlazador se emplea en un BsAb descrito en el presente documento basado en propiedades específicas impartidas al BsAb tales como, por ejemplo, un aumento en la estabilidad. En algunas realizaciones, un BsAb de la presente tecnología comprende un enlazador G_4S . En algunas realizaciones determinadas, un BsAb de la presente tecnología comprende un enlazador $(G_4S)_n$, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más.

Modificaciones de Fc. En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos

contra DLL3 de la presente tecnología comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos relativa a una región Fc natural (o la región Fc precursora), de tal manera que dicha molécula tiene una afinidad alterada por un receptor de Fc (por ejemplo, una Fc γ R), con la condición de que dicha región Fc variante no tiene una sustitución en las posiciones que realizan un contacto directo con el receptor de Fc basado en el análisis cristalográfico y estructural de las interacciones del receptor Fc-Fc tales como las divulgadas por Sonderrmann *et al.*, *Nature*, 406:267-273 (2000). Los ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que realizan un contacto directo con un receptor de Fc tal como un Fc γ R, incluyen los aminoácidos 234-239 (región bisagra), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C7E), y los aminoácidos 327-332 bucle (F/G).

En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología tiene una afinidad alterada por los receptores de activación y/o inhibición, que tienen una región Fc variante con una o más modificaciones de aminoácidos, en donde dicha una o más modificación de aminoácido es una sustitución de N297 con alanina, o una sustitución de K322 con alanina.

Modificaciones de glicosilación. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-DLL3 de la presente tecnología tienen una región Fc con variantes de glicosilación, en comparación con una región Fc precursora. En algunas realizaciones, la variante de glicosilación incluye la ausencia de fucosa; en algunas realizaciones, la variante de glicosilación es el resultado de la expresión en células CHO deficientes en GnT1.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente tecnología, pueden tener un sitio de glicosilación respecto de un anticuerpo de referencia adecuado que se une a un antígeno de interés (por ejemplo, DLL3), sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo, la actividad de unión con el antígeno. Como se utiliza en el presente documento, "sitios de glicosilación" incluye cualquier secuencia de aminoácidos específica de un anticuerpo a la que se unirá un oligosacárido (es decir, carbohidratos que contienen dos o más azúcares sencillos unidos entre sí) de forma específica y covalente.

Las cadenas laterales de oligosacárido típicamente están unidas a la cadena principal de un anticuerpo a través de enlaces N u O. La N-glicosilación se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a la cadena lateral de un resto

de asparagina. La O-glicosilación se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a un hidroxiaminoácido, por ejemplo, serina, treonina. Por ejemplo, una Fc-glicoforma (hDLL3-IgGln) que carece de ciertos oligosacáridos que incluyen fucosa y N-acetilglucosamina en el extremo se puede producir en células CHO especiales y presentan una función efectora ADCC potenciada.

En algunas realizaciones, el contenido de carbohidrato de una composición relacionada con inmunoglobulina divulgada en el presente documento se modifica mediante la adición o delección de un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido de carbohidrato de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica y están incluidos en la presente tecnología, véanse, por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 6.218.149; el documento EP 0359096B1; la publicación de patente de EE. UU. n.º US 2002/0028486; la publicación de solicitud de patente internacional WO 03/035835; la publicación de patente de EE. UU. n.º 2003/0115614; patente de EE. UU. N.º 6.218.149; patente de EE. UU. N.º 6.472.511; todos los cuales se han incorporado al presente documento como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, el contenido de carbohidrato de un anticuerpo (o porción relevante o componente del mismo) se modifica por delección de uno o más restos de carbohidrato endógenos del anticuerpo. En algunas realizaciones determinadas, la presente tecnología incluye eliminar el sitio de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, por modificación de la posición 297 de asparagina a alanina.

Las glicoformas modificadas por ingeniería pueden ser útiles para diversos fines, que incluye, aunque no de forma limitativa, potenciar o reducir la función efectora. Las glicoformas modificadas por ingeniería se pueden generar mediante cualquier método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, usando cepas modificadas por ingeniería o de expresión variable, mediante la expresión conjunta con una o más enzimas, por ejemplo N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), mediante la expresión de una molécula que comprende una región Fc en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos de interés, o mediante la modificación de uno o más carbohidratos una vez que se ha expresado la molécula que comprende la región Fc. Los métodos para generar glicoformas modificadas por ingeniería genética son conocidas en la técnica e incluyen, aunque no de forma limitativa, las descritas en Umana *et al.*, 1999, *Nat. Biotechnol.* 17: 176-180; Davies *et al.*, 2001, *Biotechnol. Bioeng.* 74:288-294; Shields *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.*

277:26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473; patente de EE. UU. N.º 6.602.684; solicitud de patente de EE. UU. con n.º de Serie 10/277.370; solicitud de patente de EE. UU. con n.º de Serie 10/113.929; publicaciones de solicitud de patente internacional WO 00/61739A1; documentos
5 WO 01/292246A1; documento WO 02/311140A1; documento WO 02/30954A1; tecnología POTILLEGENT™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); tecnología de ingeniería de glicosilación GLYCOMAB™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza); todos los cuales se han incorporado al presente documento como referencia en su totalidad. Véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de
10 patente internacional WO 00/061739; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0115614; Okazaki *et al.*, 2004, *JMB*, 336: 1239-49.

Proteínas de fusión. En una realización, el anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología es una proteína de fusión. Los anticuerpos anti-DLL3 de la presente tecnología, cuando se fusionan a una proteína secundaria, se pueden
15 utilizar como etiqueta antigénica. Los ejemplos de dominios que se pueden fusionar a polipéptidos incluyen no solamente las secuencias de señalización heterólogas, sino también otras regiones funcionales heterólogas. No es necesario que la fusión sea directa, sino que se puede producir mediante secuencias enlazadoras. Además, las proteínas de fusión de la presente
20 tecnología también se pueden modificar por ingeniería genética para mejorar las características de los anticuerpos dirigidos contra DLL3. Por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, especialmente de aminoácidos cargados, se puede añadir al extremo N de anticuerpo dirigido contra DLL3 para mejorar la estabilidad y persistencia durante la purificación desde la célula hospedadora o
25 posterior manipulación y almacenamiento. Además, también se pueden añadir restos peptídicos a un anticuerpo dirigido contra DLL3 para facilitar la purificación. Dichas regiones se pueden eliminar antes de la preparación final del anticuerpo anti-DLL3. La adición de restos peptídicos para facilitar la manipulación de los polipéptidos es una técnica familiar y rutinaria en la técnica.
30 El anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología se puede fusionar a secuencias marcadoras, tal como un péptido que facilita la purificación del polipéptido de fusión. En realizaciones seleccionadas, la secuencia de aminoácidos de marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, Calif), entre otros,
35 muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Tal como se describe

en Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824, 1989, por ejemplo, la hexa-histidina permite la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otra etiqueta peptídica de utilidad para la purificación, la etiqueta "HA", corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe. Wilson *et al.*, *Cell* 5 37: 767, 1984.

Por tanto, cualquiera de las anteriores proteínas de fusión se puede modificar genéticamente usando los polinucleótidos o los polipéptidos de la presente tecnología. También, en algunas realizaciones, las proteínas de fusión descritas en el presente documento muestran un aumento de la semivida *in vivo*.

10 Las proteínas de fusión que tienen estructuras diméricas unidas por disulfuro (debido a la IgG) pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas, en comparación con la proteína monomérica secretada, o el fragmento de proteína en solitario. Fountoulakis *et al.*, *J. Biochem.* 270: 3958-3964, 1995.

15 De forma similar, el documento EP-A-O 464 533 (análogo canadiense 2045869) divulga proteínas de fusión que comprenden varias porciones de la región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o fragmento de la misma. En muchos casos, la parte Fc de una proteína de fusión es beneficiosa en terapia y diagnóstico y, por tanto, puede car como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas. Véase el 20 documento EP-A 0232 262. Como alternativa, la delección o modificación de la parte Fc una vez que la proteína de fusión se ha expresado, detectado y purificado, puede ser deseable. Por ejemplo, la parte Fc puede impedir la terapia y el diagnóstico si la proteína de fusión se utiliza como antígeno para 25 inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, proteínas humanas, tales como hIL-5, se han fusionado con porciones Fc con el fin de que ensayos de cribado de alto rendimiento identifiquen antagonistas de hIL-5. Bennett *et al.*, *J. Molecular Recognition* 8: 52-58, 1995; Johanson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270: 9459-9471, 1995.

30 *Anticuerpos anti-DLL3 marcados.* En una realización, el anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología está acoplado con un resto marcador, es decir, un grupo detectable. La marca particular o grupo detectable conjugado con el anticuerpo dirigido contra DLL3 no es un aspecto fundamental de la tecnología, siempre que no interfiera de manera significativa con la unión específica del 35 anticuerpo anti-DLL3 de la presente tecnología a la proteína DLL3. El grupo

detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichas marcas detectables están bien desarrolladas en el campo de los inmunoensayos y obtención de imágenes. En general, prácticamente todas las marcas útiles en dichos métodos se pueden aplicar a la presente tecnología.

5 Por tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las marcas útiles en la práctica de la presente tecnología incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), tintes fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares),
10 radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{121}I , ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), otros agentes de formación de imágenes tales como microburbujas (para imágenes por ultrasonidos), ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{89}Zr (para tomografía de emisión de positrones), $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In (para tomografía por emisión de fotón único), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros habitualmente utilizados
15 en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal, o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex y similares). Las patentes que describen el uso de tales marcadores incluyen las patentes de EE.UU. N.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241, cada uno de los cuales se ha incorporado como
20 referencia en el presente documento en su totalidad y para todos los fines. Véase también Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.).

El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente deseado de un ensayo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.
25 Como se ha indicado anteriormente, se puede utilizar una amplia variedad de marcas, donde la selección de la marca depende de factores tales como la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, requisitos de estabilidad, instrumentación disponible, y provisiones de eliminación.

Las marcas no radioactivas frecuentemente están unidas por medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) está covalentemente unida a la molécula. A continuación, el ligando se une a una molécula antiligando (por ejemplo, estreptavidina) que bien es detectable por sí misma o está unida covalentemente a un sistema de señalización, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto
35 quimioluminiscente. Se pueden usar numerosos ligandos y antiligandos. Cuando

un ligando tiene un antiligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, se puede usar junto con el antiligando marcado natural. Como alternativa, se puede usar cualquier compuesto hapténico o antigénico junto con un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-DLL3.

5 Las moléculas también se pueden conjugar directamente con compuestos generadores de señal, por ejemplo, mediante la conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcas serán principalmente hidrolasas, especialmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas, u oxidorreductasas, especialmente las peroxidasas. Los compuestos fluorescentes útiles como
10 restos marcadores, incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona y similares. Los compuestos quimioluminiscente útiles como restos marcadores, incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, luciferina y 2,3-dihidroftalazinedionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de los diversos
15 sistemas de marcaje y producción de señales que pueden usarse, véase la patente de EE. UU. N.º 4.391.904.

Los medios para obtener marcas detectables son bien conocidas de los expertos en la materia. Por tanto, por ejemplo, cuando la marca es una marca radioactiva, los medios de detección incluyen un contador de centelleo o una
20 película fotográfica como en la autorradiografía. Cuando la marca es una marca fluorescente, se puede detectar por excitación del fluorocromo con la longitud de onda de la luz adecuada, y detección de la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, mediante una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga
25 acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De forma similar, las marcas enzimáticas se pueden detectar proporcionando los sustratos adecuados para la enzima y la detección del producto de reacción resultante. Finalmente, las marcas colorimétricas simples se pueden detectar simplemente observando el color asociado a la marca. Por tanto, en varios ensayos con tiras reactivas, el oro
30 conjugado aparece frecuentemente de color rosa, mientras que diferentes perlas conjugadas aparecen con el color de la perla.

Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de compuestos marcados. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana, por ejemplo, los anticuerpos anti-DLL3.
35 En este caso, las partículas revestidas de antígeno se aglutinan por muestras

que comprenden los anticuerpos diana. En este formato, ninguno de los componentes tiene que marcarse y la presencia del anticuerpo diana se detecta mediante inspección visual simple.

A. Identificación y caracterización de los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología

Métodos para identificar y/o cribar los anticuerpos anti-DLL3 dirigidos de la presente tecnología. Métodos útiles para identificar y cribar anticuerpos contra polipéptidos DLL3 para aquellos que posean la especificidad deseada por la proteína DLL3 (por ejemplo, aquellos que se unen al dominio extracelular de DLL3) incluyen las técnicas inmunomediadas conocidas en la materia. Se pueden detectar componentes de una respuesta inmunitaria *in vitro* mediante diversos métodos que son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la materia. Por ejemplo, (1) se pueden incubar linfocitos T citotóxicos con células diana marcadas radioactivamente y detectarse la lisis de estas células diana mediante la liberación de radioactividad; (2) se pueden incubar linfocitos T auxiliares con antígenos y células presentadoras de antígenos y medirse la síntesis y secreción de citoquinas mediante métodos normalizados (Windhagen A *et al.*, *Immunity*, 2: 373-80, 1995); (3) se pueden incubar células presentadoras de antígenos con antígeno de proteína completa y la presentación de este antígeno sobre MHC detectarse tanto por ensayos de activación de linfocitos T como por métodos biofísicos (Harding *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4230-4, 1989); (4) se pueden incubar mastocitos con reactivos que reticulan sus receptores Fc-épsilon y medirse la liberación de histamina mediante ensayo inmunoenzimático (Siraganian *et al.*, *TIPS*, 4: 432-437, 1983); y (5) ensayo inmunoenzimático de absorción (ELISA).

De forma similar, se pueden detectar los productos de una respuesta inmunitaria tanto en un organismo modelo (por ejemplo, un ratón) como en un sujeto humano mediante diversos métodos que son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. Por ejemplo, (1) se puede detectar fácilmente la producción de anticuerpos en respuesta a la vacunación mediante métodos normalizados usados actualmente en laboratorios clínicos, por ejemplo, un ELISA; (2) se puede detectar la migración de las células inmunitarias a los sitios de inflamación rascando la superficie de la piel y colocando un recipiente estéril para capturar las células en migración sobre el sitio del rascado (Peters *et al.*, *Blood*, 72: 1310-5, 1988); (3) se puede medir la proliferación de células

mononucleares de sangre periférica (PBMC) en respuesta a mitógenos o la reacción de linfocitos mixtos usando ^3H -timidina; (4) se puede medir la capacidad fagocítica de los granulocitos, macrófagos, y otros fagocitos en PBMC colocando PBMC en pocillos junto con las partículas marcadas (Peters *et al.*, *Blood*, 72: 1310-5, 1988); y (5) se puede medir la diferenciación de células del sistema inmunitario marcando las PBMC con anticuerpos contra moléculas CD tales como CD4 y CD8 y midiendo la fracción de las PBMC que expresa estos marcadores.

En una realización, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se seleccionan usando la expresión de péptidos DLL3 sobre la superficie de envases genéticos replicables. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5.514.548; 5.837.500; 5.871.907; 5.885.793; 5.969.108; 6.225.447; 6.291.650; 6.492.160; los documentos EP 585 287; EP 605522; EP 616640; EP 1024191; EP 589 877; EP 774 511; EP 844 306. Se han descrito métodos útiles para producir/seleccionar una partícula de un bacteriófago filamentoso que contiene un genoma de fagémido que codifica una molécula de unión con una especificidad deseada. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 774 511; US 5871907; US 5969108; US 6225447; US 6291650; US 6492160.

En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se seleccionan usando la expresión de péptidos DLL3 sobre la superficie de una célula hospedadora de levadura. Se han descrito métodos útiles para el aislamiento de polipéptidos de scFv mediante expresión en la superficie de levadura por Kieke *et al.*, *Protein Eng.* 1997 Nov; 10(11): 1303-10.

En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se seleccionan usando la expresión en ribosoma. Se han descrito métodos útiles para identificar ligandos en bibliotecas de péptidos usando la expresión en ribosoma por Mattheakis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9022-26, 1994; y Hanes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4937-42, 1997.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se seleccionan usando la expresión del ARNt en péptidos de DLL3. Se han descrito métodos útiles para la selección *in vitro* de ligandos usando la expresión del ARNt por Merryman *et al.*, *Chem. Biol.*, 9: 741-46, 2002.

En una realización, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se seleccionan usando la expresión del ARN. Se han descrito

métodos útiles para seleccionar péptidos y proteínas usando bibliotecas de expresión del ARN por Roberts *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-302, 1997; y Nemoto *et al.*, *FEBS Lett.*, 414: 405-8, 1997. Se han descrito métodos útiles para seleccionar péptidos y proteínas usando bibliotecas de expresión del
5 ARN no natural por Frankel *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13: 506-12, 2003.

En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se expresan en el periplasma de bacterias gram negativas y se mezclan con la proteína DLL3 marcada. Véase el documento WO 02/34886. En clones que expresan polipéptidos recombinantes con afinidad por la proteína
10 DLL3, la concentración de la proteína DLL3 marcada unida a los anticuerpos dirigidos contra DLL3 aumenta y permite aislar las células del resto de la biblioteca como se describe en Harvey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 22: 9193-98 2004 y publicación de patentes de EE.UU. n.º 2004/0058403.

Tras la selección de los anticuerpos dirigidos contra DLL3 deseados, se
15 contempla que dichos anticuerpos puede producirse en gran volumen mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, la expresión de células procariotas o eucariotas y similares. Los anticuerpos dirigidos contra DLL3 que son, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, anticuerpos o fragmentos híbridos dirigidos contra DLL3 que se pueden producir
20 usando técnicas convencionales para construir un vector de expresión que codifica una cadena pesada de anticuerpo en que las CDR y, si es necesario, una parte mínima del marco de la región variable, que se requiere para retener la especificidad de unión al anticuerpo de una especie originaria (como se modifica mediante ingeniería genética de acuerdo con las técnicas descritas en
25 el presente documento) se deriva del anticuerpo de la especie originaria y el resto del anticuerpo se deriva de la inmunoglobulina de una especie diana que se puede manipular como se describe en el presente documento, produciendo por tanto un vector para la expresión de una cadena pesada de un anticuerpo híbrido.

30 *Medición de la unión a DLL3.* En algunas realizaciones, un ensayo de unión a DLL3 se refiere a un formato de ensayo en donde la proteína DLL3 y un anticuerpo dirigido contra DLL3 se mezclan en condiciones adecuadas para la unión entre la proteína DLL3 y el anticuerpo dirigido contra DLL3 y la evaluación de la cantidad de la unión entre la proteína DLL3 y el anticuerpo dirigido contra
35 DLL3. La cantidad de la unión se compara con un control adecuado, que puede

ser la cantidad de la unión en ausencia de la proteína DLL3, la cantidad de la unión en presencia de una composición e inmunoglobulina no específica, o ambas. Se puede evaluar la cantidad de la unión mediante cualquier método adecuado. Los métodos de ensayo de la unión incluyen, por ejemplo, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos de proximidad por centelleo, ensayos de transferencia de energía de fluorescencia, cromatografía líquida, ensayos de filtración de membrana y similares. Los ensayos biofísicos para la medición directa de la unión de la proteína DLL3 a un anticuerpo dirigido contra DLL3 son, por ejemplo, resonancia magnética nuclear, fluorescencia, polarización de la fluorescencia, resonancia de plasmón superficial (chips BIACORE), interferometría de biocapas, y similares. Se determina la unión específica mediante ensayos normalizados conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de unión a radioligandos, ELISA, FRET, inmunoprecipitación, SPR, RMN(RMN-2D), espectrometría de masas y similares. Si la unión específica del anticuerpo candidato dirigido contra DLL3 es al menos 1 por ciento mayor que la unión observada en ausencia del anticuerpo candidato dirigido contra DLL3, el anticuerpo candidato dirigido contra DLL3 es útil como un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología.

Uso de los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología

General. Los anticuerpos de la presente tecnología son útiles en los métodos conocidos en la técnica que se refieren a la localización y/o la cuantificación de polipéptidos de DLL3 (por ejemplo, para su uso en los niveles de medición de la proteína DLL3 en las muestras fisiológicas adecuadas, para su uso en métodos de diagnóstico, para su uso en la obtención de imágenes del polipéptido, y similares). Los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología son útiles para aislar un polipéptido DLL3 mediante técnicas normalizadas, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología puede facilitar la purificación de proteínas DLL3 inmunorreactivas naturales procedentes de muestras biológicas, por ejemplo, suero o células de mamíferos así como proteínas DLL3 inmunorreactivas producidas de manera recombinante expresadas en un sistema hospedador. Además, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se pueden usar para detectar una proteína DLL3 inmunorreactiva (por ejemplo, en plasma, un lisado celular o un sobrenadante celular) a fin de evaluar la abundancia y el modelo de expresión del polipéptido

inmunorreactivo. Los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se pueden usar en diagnóstico para controlar los niveles de proteína DLL3 inmunorreactiva en tejidos como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado.

- 5 Como se ha indicado anteriormente, la detección puede estar facilitada por el acoplamiento (es decir, la unión física) de los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología a una sustancia detectable.

Detección de la proteína DLL3. Un método ilustrativo para detectar la presencia o ausencia de una proteína DLL3 inmunorreactiva en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología capaz de detectar una proteína DLL3 inmunorreactiva de tal manera que la presencia de una proteína DLL3 inmunorreactiva se detecta en la muestra biológica. La detección se puede llevar a cabo mediante un marcador detectable unido al anticuerpo.

Se pretende que el término "marcado" con respecto al anticuerpo dirigido contra DLL3 abarque el marcado directo del anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable al anticuerpo, así como el marcaje indirecto del anticuerpo mediante reactividad con otro compuesto que está marcado de forma directa, tal como un anticuerpo secundario. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcado final de una sonda de ADN con biotina, de manera que pueda detectarse con estreptavidina marcada con fluorescencia.

25 En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 divulgados en el presente documento están conjugados a uno o más marcadores detectables. Para esos usos, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 pueden marcarse de forma detectable mediante unión covalente o no covalente de un agente de contraste cromogénico, enzimático, radioisotópico, isotópico, fluorescente, tóxico, quimioluminiscente, de resonancia magnética nuclear u otro marcador.

Los ejemplos de marcadores cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina y ácido 4-hidroxiazo-benceno-2-carboxílico. Los ejemplos de marcadores enzimáticos adecuados incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, Δ -5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -

glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa.

- 5 Los ejemplos de marcadores radioisotópicos adecuados incluyen ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , etc. ^{111}In es un isótopo ilustrativo para obtención de imágenes *in vivo* usado ya que evita el problema de la deshalogenación de los anticuerpos de unión a DLL3 marcados con ^{125}I o ^{131}I por el hígado. Además,
- 10 este isótopo tiene una energía de emisión gamma más favorable para la obtención de imágenes (Perkins *et al*, *Eur. J. Nucl. Med.* 70:296-301 (1985); Carasquillo *et al*, *J. Nucl. Med.* 25:281-287 (1987)). Por ejemplo, ^{111}In acoplado a anticuerpos monoclonales con 1-(P-isotiocianatobencil)-DPTA presenta poca captación en tejidos no tumorales, especialmente en el hígado y potencia la
- 15 especificidad de la localización tumoral (Esteban *et al*, *J. Nucl. Med.* 28:861-870 (1987)). Los ejemplos de marcadores isotópicos no radioactivos adecuados incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tr y ^{56}Fe .

- Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen un marcador de ^{152}Eu , un marcador de fluoresceína, un marcador de isotiocianato,
- 20 un marcador de rodamina, un marcador de ficoeritrina, un marcador de ficocianina, un marcador de aloficocianina, un marcador de proteína verde fluorescente (GFP), un marcador de o-ftaleida y un marcador de fluorescamina. Los ejemplos de marcadores de toxinas incluyen la toxina diftérica, el ricino y la toxina colérica.

- 25 Los ejemplos de marcadores quimioluminiscentes incluyen un marcador de luminol, un marcador de isoluminol, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de luciferina, un marcador de luciferasa y un marcador de aecuatorina. Los ejemplos de agentes de contraste
- 30 para resonancia magnética nuclear incluyen núcleos de metales pesados tales como Gd, Mn y hierro.

- El método de detección de la presente tecnología se puede usar para detectar una proteína DLL3 inmunorreactiva en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para detectar una proteína DLL3
- 35 inmunorreactiva incluyen ensayos de enzimoimmunoanálisis de absorción

(ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones, radioinmunoensayo e inmunofluorescencia. Adicionalmente, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína DLL3 inmunorreactiva incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo dirigido contra DLL3 marcado. Por ejemplo, el anticuerpo dirigido contra DLL3

5 puede estar marcado con un marcador radioactivo, cuya presencia y ubicación en un sujeto se puede detectar mediante técnicas convencionales de obtención de imágenes. En una realización, la muestra biológica contiene moléculas de proteína DLL3 del sujeto de ensayo.

Inmunoensayo y diagnóstico por imágenes. Un anticuerpo dirigido contra

10 DLL3 de la actual tecnología se puede usar para evaluar niveles de proteínas DLL3 inmunorreactivas en una muestra biológica (por ejemplo, plasma humano) usando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, se puede estudiar la expresión de la proteína en tejidos con métodos inmunohistológicos clásicos. Jalkanen, M. *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101: 976-985, 1985; Jalkanen, M. *et al.*, *J. Cell.*

15 *Biol.* 105: 3087-3096, 1987. Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el enzoinmunoanálisis de absorción (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Las marcadores de anticuerpos de ensayo son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa, y radioisótopos u otros

20 agentes radioactivos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In) y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína, rodamina, y proteína fluorescente verde (GFP), así como biotina.

Además de evaluar los niveles de proteína DLL3 inmunorreactiva en una muestra biológica, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente

25 tecnología se pueden usar para el diagnóstico de imágenes *in vivo* de DLL3. Los anticuerpos útiles para este método incluyen aquellos detectables mediante radiografía de rayos X, RMN o REE. Para la radiografía de rayos X, los marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero que no son abiertamente dañinos para el sujeto.

30 Los marcadores adecuados para la RMN y la REE incluyen aquellos con un espín característico detectable, tales como deuterio, que se puede incorporar en los anticuerpos dirigidos contra DLL3 marcando los nutrientes para el clon de scFv relevante.

Un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología que se ha

35 marcado con un resto de diagnóstico por imágenes detectable adecuado, tal

como un radioisótopo (por ejemplo, ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{18}F , ^{89}Zr), una sustancia radioopaca, o un material detectable mediante resonancia magnética nuclear, se introdujo (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea, o intraperitoneal) en el sujeto. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de diagnóstico por imágenes usado determinará la cantidad del resto de imágenes necesarias para producir imágenes diagnósticas. En el caso de un resto de radioisótopo, para sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada variará normalmente entre aproximadamente 5 a 20 milicurios de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. El anticuerpo dirigido contra DLL3 marcado se acumulará a continuación en la localización de las células que contienen el polipéptido diana específico. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se acumularán dentro del sujeto en células y tejidos en los que se ha localizado la proteína DLL3.

Por tanto, la presente tecnología proporciona un método diagnóstico de una dolencia médica, que implica: (a) evaluar la expresión de la proteína DLL3 inmunorreactiva midiendo la unión de un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología en células o fluido corporal de un individuo; (b) comparar la cantidad de proteína DLL3 inmunorreactiva presente en la muestra con una referencia normalizada, en donde un aumento o disminución en los niveles de proteína DLL3 inmunorreactiva en comparación con el estándar es indicativo de una dolencia médica.

Purificación por afinidad. Los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología pueden usarse para purificar la proteína DLL3 inmunorreactiva de una muestra. En algunas realizaciones, los anticuerpos se inmovilizan sobre un soporte sólido. Los ejemplos de dichos soportes sólidos incluyen plásticos tales como policarbonato, carbohidratos complejos tales como agarosa y sefarosa, resinas acrílicas tales como perlas de poliacrilamida y látex. Las técnicas para el acoplamiento de los anticuerpos a dichos soportes sólidos son bien conocidas en la materia (Weir *et al.*, "Handbook of Experimental Immunology" 4a Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra, Capítulo 10 (1986); Jacoby *et al.*, *Meth. Enzym.* 34 Academic Press, N.Y. (1974)).

El método más sencillo de unir el antígeno a la matriz de soporte del anticuerpo es recoger las perlas en una columna y pasar la solución del antígeno a través de la columna. La eficacia de este método depende del tiempo de contacto entre el anticuerpo inmovilizado y el antígeno, que se puede extender

usando caudales bajos. El anticuerpo inmovilizado captura el antígeno a medida que pasa el flujo. Como alternativa, se puede poner en contacto un antígeno con la matriz de soporte del anticuerpo mezclando la solución de antígeno con el soporte (por ejemplo, perlas) y rotar o balancear la suspensión, permitiendo un
5 máximo contacto entre el antígeno y el anticuerpo inmovilizado. Después que se ha completado la reacción de unión, la suspensión se hace pasar a la columna para la recogida de las perlas. Las perlas se lavan usando un tampón de lavado adecuado y a continuación se eluye el antígeno puro o sustancialmente puro.

Se puede conjugar un anticuerpo o polipéptido de interés a un soporte
10 sólido, tal como una perla. Además, se puede conjugar también un primer soporte sólido tal como una perla, si se desea, a un segundo soporte sólido, que puede ser una segunda perla u otro soporte, mediante cualquier medio adecuado, incluyendo aquellos divulgados en el presente documento para la conjugación de un polipéptido a un soporte. Por consiguiente, cualquiera de los
15 métodos y medios de conjugación divulgados en el presente documento con referencia a la conjugación de un polipéptido a un soporte sólido puede también aplicarse para la conjugación de un primer soporte a un segundo soporte, donde el primer y el segundo soporte sólido ser iguales o diferentes.

Los enlazadores adecuados, que pueden ser agentes reticulantes, para
20 uso para conjugar un polipéptido a un soporte sólido incluyen una variedad de agentes que pueden reaccionar con un grupo funcional presente sobre una superficie del soporte, o con el polipéptido, o ambos. Los reactivos útiles como agentes reticulantes incluyen reactivos homobifuncionales y, en particular, reactivos heterobifuncionales. Los agentes de reticulación bifuncionales útiles
25 incluyen, aunque no de forma limitativa, N-SIAB, dimaleimida, DTNB, N-SATA, N-SPDP, SMCC y 6-HYNIC. Se puede seleccionar un agente de reticulación para proporcionar un enlace selectivamente escindible entre un polipéptido y el soporte sólido. Por ejemplo, se puede emplear un reticulador fotolabil, tal como ácido 3-amino-(2-nitrofenil)propiónico como un medio para escindir un
30 polipéptido a partir de un soporte sólido. (Brown *et al.*, *Mol. Divers*, págs, 4-12 (1995); Rothschild *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 24:351-66 (1996); y la patente de Estados Unidos n.º 5.643.722). Se conocen bien en la técnica otros reactivos de reticulación. (Véase, por ejemplo, Wong (1991), anteriormente; y Hermanson (1996), anteriormente).

35 Se pueden inmovilizar un anticuerpo o polipéptido sobre un soporte sólido,

tal como una perla, a través de un enlace amida covalente entre una perla funcionalizada con un grupo carboxilo y el término amino del polipéptido o, por el contrario, a través de un enlace amida covalente formado entre una perla funcionalizada con un grupo amino y el término carboxilo del polipéptido.

5 Además, se puede unir al soporte un enlazador de tritilo bifuncional, por ejemplo, al éster activo de 4-nitrofenilo sobre una resina, tal como una resina de Wang, a través de un grupo amino o un grupo carboxilo sobre la resina mediante una aminoresina. Usando una solución de tritilo bifuncional, el soporte sólido puede requerir tratamiento con un ácido volátil, tal como ácido fórmico o ácido
10 trifluoroacético para asegurar que el polipéptido se escinde y se puede eliminar. En tal caso, el polipéptido puede depositarse como un parche sin perla en la parte inferior de un pocillo de un soporte sólido o sobre la superficie plana de un soporte sólido. Tras la adición de una solución de matriz, el polipéptido se puede desorber en un EM.

15 Se pueden aprovechar también los enlazadores de tritilo hidrófobos como enlazadores lábiles en ácido usando un ácido volátil o una solución de matriz adecuada, por ejemplo, una solución de matriz que contiene 3-HPA, para escindir un grupo tritilo unido a amino a partir del polipéptido. Se puede cambiar también la labilidad al ácido. Por ejemplo, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo
20 o trimetoxitritilo se puede cambiar al *p*-sustituido adecuado, o más derivados de tritilamina lábiles a ácido, del polipéptido, es decir, se pueden realizar enlaces de tritil éter y tritilamina al polipéptido. Por consiguiente, se puede eliminar un polipéptido de un enlazador hidrófobo, por ejemplo, alterando negativamente la atracción hidrófoba o escindiendo los enlaces de tritiléter o tritilamina en
25 condiciones ácidas, incluyendo, si se desea, en condiciones de EM típicas, donde una matriz, tal como 3-HPA actúa como un ácido.

Los enlazadores ortogonalmente escindibles pueden ser también útiles para la unión a un primer soporte sólido, por ejemplo, una perla a un segundo soporte sólido, o para la unión de un polipéptido de interés a un soporte sólido.
30 Usando dichos enlazadores, un primer soporte sólido, por ejemplo, una perla, puede escindirse selectivamente de un segundo soporte sólido, sin escindir el polipéptido del soporte; el polipéptido puede a continuación escindirse de la perla en un momento posterior. Por ejemplo, el enlazador disulfuro, que se puede escindir usando un agente reductor, tales como DTT, puede emplearse para unir
35 una perla a un segundo soporte sólido, y se podría usar un grupo tritilo

bifuncional escindible por ácido para inmovilizar un polipéptido al soporte. Según se desee, el enlace del polipéptido al soporte sólido puede escindirse en primer lugar, por ejemplo, dejando intacto el enlace entre el primer y el segundo soporte. Los enlazadores de tritilo pueden proporcionar una conjugación covalente o

5 hidrófoba y, independientemente de la naturaleza de la conjugación, el grupo tritilo se escinde fácilmente en condiciones ácidas.

Por ejemplo, se puede unir una perla a un segundo soporte a través de un grupo enlazador que se puede seleccionar para tener una longitud y una naturaleza química tal que se fomenta la unión de alta densidad de las perlas al

10 soporte sólido, o la unión de alta densidad de los polipéptidos a las perlas. Dicho grupo enlazador puede tener, por ejemplo, una estructura de "tipo árbol", proporcionando por tanto una multiplicidad de grupos funcionales por sitio de unión sobre un soporte sólido. Los ejemplos de dicho grupo de enlace; incluyen polilisina, ácido poliglutámico, pentaeritrol y *tris*-hidroxiaminometano.

15 *Asociación de unión no covalente.* Un anticuerpo o polipéptido puede conjugarse a un soporte sólido, o un primer soporte sólido puede también conjugarse a un segundo soporte sólido, mediante una interacción no covalente. Por ejemplo, una perla magnética preparada de un material ferromagnético, que es capaz de magnetizarse, puede ser atraído a un soporte sólido magnético, y

20 puede liberarse del soporte mediante la eliminación del campo magnético. Como alternativa, se puede proporcionar el soporte sólido con un resto iónico o hidrófobo, lo que puede permitir que la interacción de un resto iónico o hidrófobo, respectivamente, con un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido que contiene un grupo tritilo unido o con un segundo soporte sólido que tiene un carácter

25 hidrófobo.

Se puede proporcionar también un soporte sólido con un miembro de un par de unión específico y, por tanto, se puede conjugar a un polipéptido o un segundo soporte sólido que contiene un resto de unión complementario. Por ejemplo, una perla revestida con avidina o con estreptavidina se puede unir a un

30 polipéptido que tiene un resto de biotina incorporado en el anterior, o a un segundo soporte sólido revestido con biotina o un derivado de biotina, tal como iminobiotina.

Debe reconocerse que cualquiera de los miembros de unión divulgados en el presente documento o conocidos de otra forma en la técnica pueden

35 invertirse. Por tanto, biotina, por ejemplo, puede incorporarse en cualquiera de

un polipéptido o un soporte sólido y, por el contrario, avidina u otro resto de unión a biotina se incorporarían en el soporte o el polipéptido, respectivamente. Otros pares de unión específicos contemplados para su uso en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, hormonas y sus receptores, enzimas, y sustratos, una secuencia de nucleótidos y su secuencia complementaria, un anticuerpo y el antígeno para el cual interactúa específicamente, y otro de dichos pares conocidos por los expertos en la materia.

A. Usos diagnósticos de los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología

General. Los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología son útiles en los métodos diagnósticos. De este modo, la presente tecnología proporciona métodos para utilizar los anticuerpos en el diagnóstico de la actividad de DLL3 en un sujeto. Los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología se pueden seleccionar de tal manera que tengan cualquier nivel de especificidad de unión al epítipo y una afinidad de unión muy alta a un polipéptido de DLL3. En general, cuanto mayor sea la afinidad de unión de un anticuerpo, se pueden llevar a cabo condiciones de lavado más restrictivas en un inmunoensayo para eliminar el material unido no específicamente sin eliminar el polipéptido diana. Por consiguiente, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología, útiles en ensayos diagnósticos tienen usualmente afinidades de unión de aproximadamente 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o 10^{12} M^{-1} . Adicionalmente, es deseable que los anticuerpos dirigidos contra DLL3 usados como reactivos diagnósticos tengan una cinética suficiente en la reacción directa hasta alcanzar el equilibrio en condiciones normalizadas en al menos 12 h, al menos cinco (5) h, o al menos una (1) hora.

Se pueden usar anticuerpos dirigidos contra DLL3 para detectar una proteína DLL3 inmunorreactiva en una variedad de formatos de ensayo normalizados. Dichos formatos incluyen inmunoprecipitación, transferencia Western, ELISA, radioinmunoensayo, y ensayos inmunométricos. Véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988); las patentes de EE.UU. números 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.879.262; 4.034.074, 3.791.932; 3.817.837; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876. Se pueden obtener muestras biológicas de cualquier tejido o fluido corporal de un sujeto. En determinadas realizaciones, el

sujeto está en una etapa temprana del cáncer. En una realización, la etapa temprana del cáncer se determina por el nivel o modelo de expresión de la proteína DLL3 en una muestra obtenida del sujeto. En determinadas realizaciones, la muestra se selecciona entre el grupo consistente en urea, la muestra se selecciona del grupo que consiste en orina, sangre, suero, plasma, saliva, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo (CSF), y tejido corporal sometido a biopsia.

Los ensayos inmunométricos o los ensayos de tipo sándwich son un formato de los métodos diagnósticos de la presente tecnología. Véanse las patentes de EE.UU. números 4.376.110, 4.486.530, 5.914.241, y 5.965.375. Dichos ensayos utilizan un anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo dirigido contra DLL3 o una población de anticuerpos dirigidos contra DLL3 inmovilizados a una fase sólida, y otro anticuerpo dirigido contra DLL3 o una población de anticuerpos dirigida contra DLL3 en solución. Típicamente, la solución de anticuerpos dirigidos contra DLL3 o una población de anticuerpos dirigida contra DLL3 se marcan. Si se usa una población de anticuerpos, la población puede contener anticuerpos de unión con diferentes especificidades de epítomos dentro del polipéptido diana. Por consiguiente, se puede usar la misma población para el anticuerpo en fase sólida y en solución. Si se usan anticuerpos monoclonales dirigidos contra DLL3, se usan el primer y el segundo anticuerpos monoclonales contra DLL3 que tienen diferentes especificidades de unión para la fase sólida y la fase en solución. Los anticuerpos de la fase sólida (denominada también como "captura") y los anticuerpos de la fase en solución (denominada también como "detección") pueden ponerse en contacto con el antígeno diana en cualquier orden o simultáneamente. Si se pone en contacto en primer lugar el anticuerpo en fase sólida, el ensayo se denomina ensayo directo. Por el contrario, si se pone en contacto en primer lugar el anticuerpo en solución, el ensayo se denomina ensayo inverso. Si la diana se pone en contacto con ambos anticuerpos simultáneamente, el ensayo se denomina ensayo simultáneo. Tras poner en contacto la proteína DLL3 con el anticuerpo dirigido contra DLL3,, se incuba una muestra durante un periodo que usualmente varía desde aproximadamente 10 min a aproximadamente 24 h y es normalmente aproximadamente 1 h. A continuación se lleva a cabo una etapa de lavado para eliminar componentes de la muestra no unidos específicamente al anticuerpo dirigido contra DLL3 que se está usando como reactivo de diagnóstico. Cuando los anticuerpos en fase sólida

y en solución se unen en etapas separadas, se puede llevar a cabo un lavado tras cualquiera o ambas etapas de unión. Tras el lavado, se cuantifica la unión, detectando normalmente un marcador unido a la fase sólida a través de la unión e un anticuerpo específico de la solución marcada. Usualmente para un par dado de anticuerpos o poblaciones de anticuerpos y condiciones de reacción dadas, se prepara una curva de calibración a partir de las muestras que contienen concentraciones conocidas de un antígeno diana. Las concentraciones de la proteína DLL3 inmunorreactiva en muestras, se ensayan y a continuación se leen mediante interpolación de la curva de calibración (es decir, la curva normalizada). Se puede medir el analito tanto a partir de la cantidad de anticuerpo específico para la solución marcada unido en equilibrio como mediante mediciones cinéticas del anticuerpo específico para la solución marcada unido en una serie de puntos temporales antes de que se alcance el equilibrio. La pendiente de dicha curva es una medida de la concentración de la proteína DLL3 en una muestra.

Los soportes adecuados para su uso en los métodos anteriores incluyen, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa, membranas de nailon, y membranas de nailon derivatizadas, y también partículas, tales como agarosa, un gel basado en dextrano, tiras reactivas, partículas, microesferas, partículas magnéticas, tubos de ensayo, pocillos de microtitulación, SEPHADEX™ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.), y similares. La inmovilización puede ser mediante absorción o mediante enlace covalente. Opcionalmente, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 se pueden unir a una molécula enlazadora, tal como biotina para la unión a un enlazador unido a superficie, tal como avidina.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología conjugado a un agente de diagnóstico. El agente de diagnóstico puede comprender un marcador radioactivo o no radioactivo, un agente de contraste (tal como para obtención de imágenes de resonancia magnética, tomografía computerizada o ultrasonidos), y el marcador radioactivo puede ser un isótopo emisor de radiación gamma, radiación beta, radiación alfa, electrones Auger, o isótopos emisores de positrones. Un agente de diagnóstico es una molécula que se administra conjugada a un resto de anticuerpo, es decir, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o fragmentación, y es útil en el diagnóstico o la detección de una enfermedad localizando las células que contienen el antígeno.

Los agentes de diagnóstico útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, radioisótopos, tintes (tales como el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos fluorescentes o moléculas y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos) para obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM). La patente de EE. UU. n.º 6.331.175 describe la técnica IRM y la preparación de anticuerpos conjugados a un agente potenciador de la IRM y se ha incorporado por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, los agentes de diagnóstico se seleccionan del grupo que consiste en radioisótopos, agentes potenciadores para su uso en obtención de imágenes de resonancia magnética y compuestos fluorescentes. Para cargar un componente de anticuerpo con metales radioactivos o iones paramagnético, puede ser necesario hacer reaccionar este con un reactivo que tenga una cola larga a la cual se unen una multiplicidad de grupos quelantes para la unión de los iones. Dicha cola puede ser un polímero tal como polilisina, un polisacárido u otra cadena derivatizada o derivatizable que tenga grupos colgantes a los que se puedan unir grupos quelantes tales como, por ejemplo, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA), porfirinas, poliaminas, éteres de corona, bistiosemicarbazonas, polioximas, y grupos similares conocidos por ser útiles para este fin. Se pueden acoplar quelados a los anticuerpos de la presente tecnología usando químicas normalizadas. El quelado se une normalmente al anticuerpo mediante un grupo que permite la formación de un enlace a la molécula con una pérdida mínima de inmunorreactividad y una mínima agregación y/o reticulación interna. Otros métodos y reactivos para conjugar quelados a los anticuerpos se divulgan en la patente de EE.UU. n.º 4.824.659. Las combinaciones de quelados metálicos particularmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos de monometilo y ciclohexilo, usados con isótopos de diagnóstico para la obtención de imágenes radiológicas. Los mismos quelatos, cuando se complejan con metales no radioactivos, tales como manganeso, hierro y gadolinio, son útiles para la IRM, cuando se usan junto con los anticuerpos contra DLL3 de la presente tecnología.

B. Usos terapéuticos de los anticuerpos dirigidos contra DLL3 de la presente tecnología

Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la presente tecnología son de utilidad en el tratamiento de cánceres asociados a DLL3. Dicho

tratamiento se puede usar en pacientes identificados por tener niveles patológicamente elevados de DLL3 (por ejemplo, aquellos diagnosticados por los métodos descritos en el presente documento) o en pacientes diagnosticados con una enfermedad conocida por estar asociada con dichos niveles patológicos.

- 5 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer asociado a DLL3 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) de la presente tecnología. Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar mediante los anticuerpos de la presente tecnología incluyen, aunque no de
10 forma limitativa: cáncer de pulmón microcítico (CPM), carcinoma neuroendocrino macrocítico (CNEM), cánceres neuroendocrinos pulmonares, cánceres neuroendocrinos extrapulmonares y melanoma.

- Las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología se pueden emplear junto con otros agentes terapéuticos útiles en el
15 tratamiento de cánceres asociados con DLL3. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente tecnología se pueden administrar por separado, de forma secuencial o simultáneamente con al menos un agente terapéutico adicional, o conjugarse con al menos un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en compuestos derivados de
20 productos marinos (por ejemplo, dolastatina 10, auristatinas, tasidotina, dolastatina 15 o variantes de la misma, monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF)) (Véase Newman y Cragg, *Mar Drugs*. abril de 2017; 15(4): 99), agentes de la vinca, fármacos antiestrogénicos, inhibidores de la aromatasa, agentes supresores ováricos, inhibidores de VEGF/VEGFR,
25 inhibidores de PARP, alcaloides citostáticos, antibióticos citotóxicos, antimetabolitos, agentes endocrinos/hormonales, agentes de terapia con bifosfonato y agentes de terapia biológica dirigida (por ejemplo, los péptidos terapéuticos descritos en los documentos US 6306832, WO 2012007137, WO 2005000889, WO 2010096603, etc.), agentes alquilantes, alquil sulfonatos,
30 amanitina, aziridinas, etileniminas y metilamelaminas, acetogeninas, una camptotecina, briostatina, calistatina, CC-1065, criptoficinas, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, una sarcodictina, espongistatina, mostazas nitrogenadas, antibióticos, antibióticos de enediína, dinemicina, bisfosfonatos, esperamicina, cromóforos de antibióticos de enediína
35 relacionados como cromoproteínas, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina,

azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorrubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de purina, andrógenos, antiadrenérgicos, reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, una epotilona, etoglúcido, nitrato de galio, hidrox urea, lentinano, lonidainina, maitansinoides, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, Complejo de polisacárido PSK®(JHS Natural Products, Eugene, OR), razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; vemurafenib; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, clorambucilo; GEMZAR® gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE®vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11), inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina; retinoides; capecitabina; combretastatina; leucovorina; oxaliplatino; inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR y VEGF-A que reducen la proliferación celular y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, el al menos un agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos específicos incluyen, aunque no de forma limitativa, ciclofosfamida, fluorouracilo (5-fluorouracilo o 5-FU), metotrexato, edatrexato (10-etil-10-deaza-aminopterina), tiotepa, carboplatino, cisplatino, taxanos, paclitaxel, paclitaxel unido a proteína, docetaxel, vinorelbina, tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno, fulvestrant, gemcitabina, irinotecán, ixabepilona, temozolmida, topotecán, vincristina,

vinblastina, eribulina, mutamicina, capecitabina, anastrozol, exemestano, letrozol, leuprolida, abarelix, buserlina, goserelina, acetato de megestrol, risedronato, pamidronato, ibandronato, alendronato, denosumab, zoledronato, trastuzumab, tykerb, antraciclinas (p. ej., daunorrubicina y doxorrubicina),
 5 bevacizumab, oxaliplatino, melfalán, etopósido, mecloretamina, bleomicina, venenos de los microtúbulos, acetogeninas anonáceas, auristatinas, maitansinoides, tubulisinas, caliqueamicinas, duocarmicinas, benzodiazepinas, camptotecinas o combinaciones de los mismos.

Otros agentes anticancerosos compatibles comprende compuestos
 10 comercial o clínicamente disponibles tales como erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, N.º de CAS 51-21-8), PD-0325901 (n.º de CAS 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), N.º de CAS 15663-27-1), carboplatino (n.º de CAS 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®,
 15 Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo- 2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, N.º de CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) y doxorrubicina
 20 (ADRIAMYCIN®). Los agentes anticancerosos adicionales comercial o clínicamente disponibles comprende bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, Documento WO 2007/044515, ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array
 25 BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de la PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ 235 (inhibidor de la PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de la PI3K r, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®), Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline),
 30 lonafarnib (SARAS AR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®), BAY43- 9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®), AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (sin Cremophor), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel modificadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners,
 35 Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca),

clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); vinorelbina (NAVELBINE®); capecitabina (XELODA®, Roche), tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno, FARESTON® (citrato de toremifemo) MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); dabrafmib (TAFINLAR®, GlaxoSmithKline); dasatinib (SPRYCEL®, Bristol-Myers Squibb); trametinib (MEKINIST®, GlaxoSmithKline); nilotinib (TASIGNA®, Novartis), troxacitabina (un análogo nucleosídico de 1,3-dioxolano citosina; oligonucleótidos de sentido contrario, ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® Inhibidor de la topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina y Esperamicinas y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Las composiciones de la presente tecnología se pueden administrar opcionalmente como un bolo único a un sujeto que lo necesita. Como alternativa, el régimen de dosificación puede comprender múltiples administraciones realizadas en distintos momentos después de la aparición de los tumores.

La administración se puede llevar a cabo mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo las vías oral, intranasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea), vía rectal, por vía intracraneal, intratumoral, intratecal o tópica. La administración incluye la autoadministración y la administración por un tercero. También se apreciará que los diversos modos de tratamiento de dolencias médicas que se describen pretenden significar "sustancial", que incluye el tratamiento total pero también menos del tratamiento total, y en donde se consigue algún resultado biológica o médicamente relevante.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente tecnología comprenden formulaciones farmacéuticas que se pueden administrar a los sujetos que lo necesitan en una o más dosis. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica).

Típicamente, una cantidad eficaz de las composiciones de anticuerpo de la presente tecnología, suficiente para conseguir un efecto terapéutico, están comprendidas de aproximadamente 0,000001 mg por kilogramo de peso

corporal al día hasta aproximadamente 10.000 mg por kilogramo de peso corporal al día. Típicamente, los intervalos de dosificación son de aproximadamente 0,0001 mg por kilogramo de peso corporal al día hasta aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día. Para la

5 administración de los anticuerpos anti-DLL3, la dosis está comprendida de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, cada dos semanas o cada tres semanas, del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas, o en un

10 intervalo de 1-10 mg/kg cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas. En una realización, una única dosificación del anticuerpo está comprendida de 0,1-10.000 microgramos por kg de peso corporal. En una realización, las concentraciones de anticuerpo en un transportador están comprendidas de 0,2 a 2000 microgramos por mililitro administrado. Un régimen de tratamiento

15 ilustrativo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los anticuerpos dirigidos contra DLL3 se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser horarios, diariamente, semanalmente, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique

20 midiendo los niveles de anticuerpos en sangre del sujeto. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpos en suero de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 125 µg/ml, de 100 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml, de aproximadamente 125 µg/ml a aproximadamente 175 µg/ml, o de aproximadamente 150 µg/ml a

25 aproximadamente 200 µg/ml. Como alternativa, los anticuerpos dirigidos contra DLL3 se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia pueden variar dependiendo de la semivida del anticuerpo en el sujeto. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el

30 tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, o hasta que el sujeto

35 muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A

continuación, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar un tumor en un sujeto *in vivo* que comprende (a) administración al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo (o fragmento del mismo) de unión a antígeno de la presente tecnología, en donde el anticuerpo está configurado para localizar un tumor que expresa DLL3 y está marcado con un radioisótopo; y (b) detectar la presencia de un tumor en el sujeto detectando los niveles de radiación emitidos por el anticuerpo que superan un valor de referencia. En algunas realizaciones, el valor de referencia se expresa como dosis inyectada por gramo (%ID/g). El valor de referencia se puede calcular midiendo los niveles de radiación presentes en tejidos no tumorales (normales) y calculando los niveles de radiación promedio presentes en tejidos no tumorales (normales) $\pm$ desviación estándar. En algunas realizaciones, la relación de los niveles de radiación entre un tejido tumoral y un tejido normal es de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 o 100:1.

En algunas realizaciones, al sujeto se le diagnostica, o se sospecha que tiene cáncer. Los niveles de radiación emitidos por el anticuerpo se pueden detectar mediante tomografía de emisión de positrones o tomografía computerizada por emisión de fotón único.

De manera adicional o alternativa, en algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la presente tecnología conjugado a un radionucleido. En algunas realizaciones, el radionucleido es un isótopo emisor de partículas alfa, un isótopo emisor de partículas beta, un emisor Auger o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de isótopos emisores de partículas beta incluyen ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{165}Dy , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu y ^{67}Cu . Los ejemplos de isótopos emisores de partículas alfa incluyen ^{213}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{152}Dy , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi , ^{221}Fr , ^{217}At y ^{255}Fm . Los ejemplos de emisores Auger incluyen ^{111}In , ^{67}Ga , ^{51}Cr , ^{58}Co , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{119}Sb , ^{161}Ho , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{201}Tl y ^{203}Pb . En algunas realizaciones del método, la unión dependiente de FcR no específica en tejidos normales se elimina o se reduce (por ejemplo, mediante la mutación N297A en la región Fc, que da como resultado una aglicosilación). La eficacia terapéutica de dicho inmunoconjugado se puede determinar calculando la relación entre el área bajo la curva (ABC) del

tumor y la ABC del tejido normal. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una relación ABC tumoral:ABC del tejido normal de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 o 100:1.

5 *Toxicidad.* De manera óptima, una cantidad eficaz (por ejemplo, dosis) de un anticuerpo dirigido contra DLL3 descrito en el presente documento proporcionará un beneficio terapéutico sin producir toxicidad sustancial al sujeto. La toxicidad del anticuerpo dirigido contra DLL3 descrito en el presente documento se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos
10 convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) o la DL₁₀₀ (la dosis letal para el 100 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la
15 formulación de un intervalo de dosificación que no es tóxico para su uso en seres humanos. La dosis del anticuerpo dirigido contra DLL3 descrita en el presente documento se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma
20 farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista del estado del sujeto. Véanse, por ejemplo, Fingl *et al.*, En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1 (1975).

Formulations de Pharmaceutical Compositions. De acuerdo con los
25 métodos de la presente tecnología, el anticuerpo dirigido contra DLL3 puede incorporarse a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden anticuerpo recombinante o sustancialmente purificado y un transportador farmacéuticamente aceptable. en una forma adecuada para su administración a
30 un sujeto. Los transportadores farmacéuticamente aceptables pueden determinarse en parte por la composición particular que se administre, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una gran diversidad de formulaciones de composiciones farmacéuticas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos
35 (Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing

Co., Easton, 18^a ed. 1990). Las composiciones farmacéuticas se formulan en general como estériles, sustancialmente isotónicas y en total cumplimiento con todas las normas de las prácticas correctas de fabricación (GMP, forma siglada de *Good Manufacturing Practice*) de la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos.

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable", y variaciones gramaticales de las mismas, que se refieren a composiciones, transportadores, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales pueden administrarse a un sujeto o sobre él sin la producción de efectos fisiológicos indeseables en un grado que prohibiría la administración de la composición. Por ejemplo, "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico en seres humanos. Dichos excipientes pueden ser un sólido, líquido, semisólido o, en caso de una composición en aerosol, gaseoso. "Sales y ésteres farmacéuticamente aceptables" significa sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales pueden formarse donde los protones ácidos presentes en las composiciones pueden reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, por ejemplo, sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas tales como bases de amina, por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Dichas sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y ácidos alcano y arenosulfónicos tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfonilo, y fosfonilo presentes en el anticuerpo dirigido contra DLL3, por ejemplo, ésteres de alquilo C₁₋₆. Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal o éster farmacéuticamente aceptable puede ser un mono-ácido-mono-sal o éster o una di-sal o éster; y de manera similar donde hay más de dos grupos ácidos presentes, algunos o todos de tales grupos pueden estar salificados o

esterificados. Un anticuerpo dirigido contra DLL3 citado en esta tecnología puede estar presente en forma no salificada o no esterificada, o en forma salificada y/o esterificada, y la denominación de dicho anticuerpo dirigido contra DLL3 pretende incluir tanto el compuesto original (no salificado y no esterificado) y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. Además, ciertas realizaciones de la presente tecnología pueden estar presentes en más de una forma estereoisomérica, y la denominación de dicho anticuerpo dirigido contra DLL3 pretende incluir todos los estereoisómeros individuales y todas las mezclas (tanto racémicas como otras) de dichos estereoisómeros. Un experto habitual en la técnica, no tendría dificultad en determinar el calendario adecuado, secuencias y dosificaciones de administración para fármacos en particular y composiciones de la presente tecnología.

Los ejemplos de tales transportadores o diluyentes incluyen, aunque no de forma limitativa, agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina humana al 5 %. También pueden utilizarse liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. El uso de tales medios y compuestos para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Salvo en la medida que cualquier medio o compuesto convencional sea incompatible con el anticuerpo dirigido contra DLL3, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la presente tecnología se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Las composiciones de anticuerpos anti-DLL3 de la presente tecnología se pueden administrar mediante las vías parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intradérmica, transdérmica, rectal, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal; o intramuscular, o como inhalantes. El anticuerpo dirigido contra DLL3 se puede administrar opcionalmente junto con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de diversos cánceres asociados a DLL3.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tales como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; compuestos antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; compuestos

quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y compuestos para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (en los casos donde sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición ha de ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos compuestos antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un compuesto que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un anticuerpo dirigido contra DLL3 de la presente tecnología a un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones mediante la incorporación del anticuerpo

dirigido contra DLL3 a un transportador estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y

5 liofilización, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración. Los anticuerpos de la presente tecnología se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que se puede formular de tal forma que permita una liberación sostenida

10 o pulsátil del principio activo.

Las composiciones orales incluyen en general un diluyente inerte o un transportador comestible. Pueden atraparse en cápsulas de gelatina o compactarse formando comprimidos. Con el fin de la administración terapéutica oral, el anticuerpo dirigido contra DLL3 puede incorporarse con excipientes y

15 utilizarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un transportador líquido para usar como enjuague bucal, en donde el compuesto en el transportador líquido se aplica por vía oral y se usa como enjuague, y se expectora o ingiere. Pueden incluirse como parte de la composición compuestos aglutinantes y/o materiales

20 adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tales como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o

25 almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un abrillantador tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, el anticuerpo dirigido contra DLL3

30 se suministra en forma de una pulverización en aerosol a partir de un recipiente o dispensador a presión que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en

35 la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos

penetrantes se conocen generalmente en la materia, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el anticuerpo dirigido contra DLL3 se formula en pomadas, bálsamos, geles o cremas, como se conoce generalmente en la materia.

El anticuerpo dirigido contra DLL3 también puede prepararse como composiciones farmacéuticas en forma de supositorios (por ejemplo, con bases para supositorios convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

En una realización, el anticuerpo dirigido contra DLL3 se prepara con vehículos que protegerán el anticuerpo dirigido contra DLL3 contra su rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para preparar dichas formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse en el mercado a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden utilizar como vehículos farmacéuticamente aceptables suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos). Estas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.522.811.

C. Kits

La presente tecnología proporciona kits para la detección y/o el tratamiento de cánceres asociados a DLL3, que comprenden al menos una composición relacionada con la inmunoglobulina de la presente tecnología (por ejemplo, cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento), o una variante funcional (variante de sustitución) de los mismos. Opcionalmente, los componentes anteriormente descritos de los kits de la presente tecnología se envasan en recipientes adecuados y se marcan para el diagnóstico y/o el tratamiento de cánceres asociados a DLL3. Los componentes anteriormente mencionados pueden almacenarse en recipientes unitarios o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas, viales, botellas, jeringas y

tubos de ensayo, como una solución acuosa, preferentemente estéril o como una formulación liofilizada, preferentemente estéril para reconstitución. El kit puede comprender además un segundo recipiente que mantiene un diluyente adecuado para diluir la composición farmacéutica hasta un volumen mayor. Los diluyentes
5 adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, el excipiente farmacéuticamente aceptable de la composición farmacéutica y una solución salina. Adicionalmente, el kit puede comprender instrucciones para diluir la composición farmacéutica y/o instrucciones para administrar la composición farmacéutica, tanto diluidos como no. Se pueden formar los recipientes a partir
10 de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico y pueden tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El kit puede comprender además más recipientes que comprenden un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina
15 tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, medio de cultivo para uno o más de los hospedadores adecuados. Los kits pueden incluir opcionalmente instrucciones habitualmente incluidas en los envases
20 comerciales de productos terapéuticos o diagnósticos, que contienen información acerca de, por ejemplo, las indicaciones, uso, dosificación, fabricación, administración, contraindicaciones y/o advertencias que se refieren al uso de dichos productos terapéuticos o diagnósticos.

Los kits son útiles para detectar la presencia de una DLL3 inmunorreactiva
25 en una muestra biológica, por ejemplo, un fluido corporal que incluye, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, suero, plasma, linfa, líquido quístico, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico o sangre e incluye muestras de biopsia de tejido corporal. Por ejemplo, el kit puede comprender: uno o más anticuerpos dirigidos contra DLL3 humanizados, quiméricos o biespecíficos de
30 la presente tecnología (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) capaces de unirse a una DLL3 en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de DLL3 en la muestra; y medios para comparar la cantidad de DLL3 inmunorreactiva en la muestra con un patrón. Uno o más de los anticuerpos dirigidos contra DLL3 pueden estar marcados. Los componentes del kit, (por
35 ejemplo, reactivos) pueden envasarse en un recipiente adecuado. El kit puede

comprender además instrucciones para usar el kit para detectar la DLL3 inmunorreactiva.

Para los kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo, 1) un primer anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo contra DLL3 humanizado, quimérico o biespecífico de la presente tecnología (o un fragmento de unión a antígeno de los mismos), unido a un soporte sólido, que se une a un polipéptido de DLL3; y, opcionalmente; 2) un segundo, anticuerpo diferente que se une a cualquiera del polipéptido de DLL3 o al primer anticuerpo, y se conjuga a un marcador detectable.

El kit puede comprender también, por ejemplo, un agente tamponante, un conservante o un agente estabilizante de la proteína. El kit puede comprender además los componentes necesarios para detectar el marcador detectable, por ejemplo, una enzima o un sustrato. El kit puede contener también una muestra de control o una serie de muestras de control, que se pueden evaluar y comparar con la muestra de ensayos. Cada componente del kit puede encerrarse en un recipiente individual y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un único envase, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos llevados a cabo utilizando el kit. Los kits de la presente tecnología pueden contener un producto escrito sobre o en el recipiente del kit. El producto escrito describe como usar los reactivos contenidos en el kit, por ejemplo, para la detección de un polipéptido DLL3 *in vitro* o *in vivo*, o para el tratamiento de cánceres asociados a DLL3 en un sujeto que lo necesita. En determinadas realizaciones, el uso de los reactivos puede ser de acuerdo con los métodos de la presente tecnología.

EJEMPLOS

La presente tecnología se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera. Los siguientes ejemplos demuestran la preparación, caracterización y uso de anticuerpos dirigidos contra DLL3 ilustrativos de la presente tecnología.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales

El dominio extracelular (ECD) de DLL3 (número de registro del GenBank Q9NY J7-1) que corresponde a los aminoácidos Ala27-Ala479 con una etiqueta 6×His en el extremo C producida en células HEK293T que expresan de forma estable DLL3 de longitud completa se usó como inmunógeno. Ratones Ablexis AlivaMAb Kappa (Ablexis, San Diego, CA) que hospedaban un repertorio de

inmunoglobulinas humanas se inmunizaron tanto con DLL3-ECD soluble o bien con células estables siguiendo técnicas de inmunización convencionales durante un periodo de 3 semanas. Se extrajeron esplenocitos y células de ganglios linfáticos drenantes procedentes de ratones con títulos séricos elevados de DLL3
 5 específicos y se fusionaron con células de mieloma de ratón para generar hibridomas usando electrofusión. A continuación se cribaron estos hibridomas para identificar la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a DLL3-ECD soluble mediante ELISA y proteína DLL3 de longitud completa en
 10 células 293 precursoras. Se seleccionaron los hibridomas para las investigaciones adicionales por clasificación mediante citometría de flujo según la intensidad de la tinción en transfectantes 293 DLL3 con la tinción 4°C/37°C como se describe a continuación.

Ejemplo 2: Ensayo de internalización 4/37 con los anticuerpos monoclonales 6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A

Los cuatro anticuerpos monoclonales (6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A) se compararon por su capacidad para internalizar DLL3 comparando la tinción a 4 °C con esta a 37 °C. Un anticuerpo SC16 monoclonal de referencia, conocido por internalizarse a través de DLL3 y que tiene actividad ADC, y que se había
 20 notificado en la bibliografía anteriormente, se usó como control positivo para la internalización. Se recogieron células NCI-H82 en crecimiento exponencial con tripsina/EDTA, se lavaron una vez en RPMI que contenía suero de feto de ternera al 10 % (FCS) y se resuspendieron en DMEM suplementado con FCS al 10 % a 2×10^7 células/ml. Se añadieron 100 μ l (2×10^6 células) a placas de 96 pocillos
 25 con fondo en U. Los anticuerpos monoclonales de ensayo (6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B o 10-O18-A) o el anticuerpo monoclonal de referencia se añadieron a pocillos separados para obtener una concentración final de 10 μ g/ml en placas duplicadas. Ambas placas se mantuvieron a 4 °C durante 30 minutos, después de lo cual ambas placas se lavaron 2× con RPMI frío suplementado con FCS al
 30 10 % y se resuspendieron en RPMI suplementado con FCS al 10 %. Una placa se mantuvo a 4 °C (la placa del control) y la otra placa se incubó a 37 °C en una estufa incubadora de CO₂ (la placa experimental). Tras 4 horas de incubación a 37 °C en una estufa incubadora de CO₂ para la placa experimental y a 4 °C para la placa del control, las células se lavaron 3 veces a 4 °C con tampón de lavado
 35 frío (PBS que contiene BSA al 0,5 %). A continuación las muestras se

resuspendieron en tampón de lavado frío+R-Ficoeritrina-AffiniPure Fragmento F(ab')₂ de la IgG de cabra dirigido contra Ig de ratón (Jackson 115-116-071) a una concentración final de 7 µg/ml en tampón de lavado. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavaron tres veces en tampón de lavado frío y se fijaron en paraformaldehído en PBS 0,5 % y se analizaron mediante citometría de flujo en 48 horas. Las relaciones de intensidad del medio fluorescente (MFI) calculadas dividiendo la MFI obtenida de la placa del control (que se incubó con los anticuerpos a 4 °C) por la MFI correspondiente obtenida a partir de la placa experimental (que se incubó con los anticuerpos a 37 °C) se tomaron como una medida relativa de internalización. Un valor alto indicó una mayor internalización. Como se muestra en la Tabla siguiente, todos los anticuerpos monoclonales (6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A) fueron capaces de internalizarse durante la unión a DLL3 pero no en la cantidad del anticuerpo monoclonal de referencia.

Clon	Relación MFI
6-G23-F	1,67
2-C8-A	1,76
7-I1-B	1,68
10-O18-A	1,56
Anticuerpo monoclonal de referencia	2,66
IgG1 de ratón	1,28

15

Estos resultados demuestran que las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología experimentan la internalización mediante la unión a DLL3. Por consiguiente, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas divulgadas en el presente documento son útiles para administrar agentes terapéuticos a células cancerosas positivas para DLL3.

20

Ejemplo 3: Ensayo de inactivación de la internalización de anticuerpos monoclonales 6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A.

Para clasificar los anticuerpos monoclonales con respecto a la internalización, se utilizó un Ensayo de inactivación de la internalización. Este método refleja la internalización y la entrada en la ruta endosoma/lisosoma. Un F(ab) de IgG1 de cabra dirigido contra Ig de ratón (Jackson Immunoresearch 115-007-185) se marcó por duplicado con el Dy light Dy650 éster NHS (Thermofisher 02206) y un LICOR IRDye QC1 éster NHS (LICOR 929-7030) (el

25

anticuerpo marcado por duplicado se denomina "F(ab) Dy650-QC1" en el presente documento). El principio de este ensayo es el siguiente: F(ab) Dy650-QC1 no es fluorescente debido a que la fluorescencia de Dy light Dy650 está inactivada por IRDye QC1. Sin embargo, tras la internalización, el F(ab) Dy650-QC1 se degrada a través de la ruta endosoma/lisosoma, y la liberación resultante del IRDye QC1 hace que se pueda observar la fluorescencia de Dy light Dy650. Por consiguiente, la señal de fluorescencia de Dy light Dy650 se tomó como medida de internalización a través de los lisosomas. En resumen, se recogieron células NCI-H82 en crecimiento exponencial con tripsina/EDTA, se lavaron una vez en medio de crecimiento RPMI suplementado con FCS al 10 % y se resuspendieron en medio de crecimiento y se añadieron $1,25 \times 10^6$ células (80 μ l) por pocillo. Se mezclaron anticuerpos monoclonales contra DLL3 a una concentración de 200 μ g/ml con el Dy650 QC1 de cabra dirigido contra IgG1 de ratón a 200 μ g/ml a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se añadieron 20 μ l de la mezcla a las células. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavaron dos veces con el medio de crecimiento, se resuspendieron en el medio de crecimiento y se transfirieron a 37 °C a una estufa incubadora de CO₂ durante 4 horas para permitir la internalización. A continuación se lavaron las células 2× con PBS frío en hielo que contenía BSA al 0,5 % y se analizaron mediante citometría de flujo, y se determinó la Intensidad fluorescente media. La Intensidad fluorescente media del anticuerpo monoclonal de referencia del control se ajustó a una internalización del 100 %. Como se muestra en la Tabla siguiente, los cuatro anticuerpos monoclonales demostraron internalización y entrada en la ruta endosoma/lisosoma.

Clon	Fluorescencia de Dy light Dy658 (% del Anticuerpo monoclonal de referencia del control)
6-G23-F (10 μ g/ml)	76,5
7-I1-B (10 μ g/ml)	70,1
2-C8-A (10 μ g/ml)	62,9
10-O18-A (10 μ g/ml)	62,2
Control con isotipo	20

25

Estos resultados demuestran que las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología experimentan la internalización mediante la unión a DLL3 y penetran en el compartimento fagosoma/lisosoma

de las células. Por consiguiente, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas divulgadas en el presente documento son útiles para administrar agentes terapéuticos a células cancerosas positivas para DLL3.

Ejemplo 4: Ensayo del Fab ZAP para el panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra DLL3.

Se usó un ensayo del Fab ZAP como otro medio para medir la internalización. El ensayo del Fab ZAP mide la administración de una toxina a una célula mediante la internalización del anticuerpo monoclonal dirigido contra DLL3. El ensayo del Fab ZAP utiliza la toxina saporina conjugada con el F(ab) dirigido contra la cadena pesada y la cadena ligera de la Ig de ratón para etiquetar los anticuerpos monoclonales con toxina. Se utilizó un kit de Advanced Targeting Systems y se empleó el protocolo de ensayo del Fab ZAP para caracterizar el panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra DLL3. En resumen, se recogieron células NCI-H82 en crecimiento exponencial con tripsina/EDTA, se lavaron una vez en RPMI suplementado con FCS al 10 % y se sembraron en placas a 5000 células/pocillo en placas sólidas de color blanco de 96 pocillos en 100 µl de RPMI suplementado con FCS al 10 %. Al día siguiente, 25 µl de los anticuerpos monoclonales purificados (G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B o 10-O18-A) o el anticuerpo monoclonal de referencia, se añadieron a una concentración inicial de 10 µg/ml y se realizaron diluciones seriadas tres veces. Se añadió F(ab) conjugado con saporina dirigido contra las cadenas HL de Ig de ratón (Fab ZAP) en 25 µl para proporcionar una concentración final de 4,4 nM. Después de 3-4 días se añadió un volumen igual de Cell Titre Glow (Promega G7571) a la placa, que se agitó en un agitador orbital durante 2 minutos y tras 10 minutos más a temperatura ambiente, se leyó la luminiscencia usando un lector de placas. Se ensayaron todos los anticuerpos monoclonales como titulaciones completas para negar el efecto prozona. Como se muestra en la **FIG. 1** y en la Tabla siguiente, todos los anticuerpos monoclonales presentaron actividad citotóxica, comparable con la del anticuerpo monoclonal de referencia. En otros experimentos con estos anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal del control contra IgG1 de ratón no presenta actividad citotóxica. Por consiguiente, estos resultados demuestran que la actividad citotóxica está mediada a través del reconocimiento de DLL3 y no a través de los FcR.

	% de destrucción máxima de SC16 contra el FAB ZAP
6-G23-F (10 µg/ml)	94,0
7-I1-B (10 µg/ml)	97,0
10-O18-A (10 µg/ml)	88,0
2-C8-A (10 µg/ml)	89,0

Estos resultados demuestran que las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología pueden administrar agentes terapéuticos a tumores que expresan DLL3 sobre su superficie celular. Por consiguiente, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas divulgadas en el presente documento son útiles para administrar agentes terapéuticos a células cancerosas positivas para DLL3.

Ejemplo 5: Preclasificación de epítomos del panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra DLL3.

El panel de anticuerpos monoclonales purificados dirigidos contra DLL3 y el anticuerpo monoclonal de referencia se sometieron a preclasificación de epítomos por parejas en una plataforma de ensayo matricial de resonancia de plasmón superficial (SPR) Carterra® (Carterra® Inc., Salt Lake City UT) donde cada anticuerpo monoclonal se ensayó según captura del antígeno de DLL3 etiquetado con histidina (DLL3-His), y también por competición con cada anticuerpo diferente en el panel por la unión a DLL3-His. Los anticuerpos se inmovilizaron sobre un chip HC200M (ligando) mediante técnicas convencionales de acoplamiento de aminos mediante el método de matriz de impresión. A continuación, se inyectó antígeno en cada ciclo a través de toda la matriz seguido por un único anticuerpo (analito). Al final de cada ciclo se regeneró la superficie para eliminar el antígeno y el analito antes de que comenzara un nuevo ciclo. Como se muestra en la Tabla siguiente, se identificaron tres clases diferentes en el panel cartografiando 7-I1-B y 2-C8-A en la clase 2 mientras que 6-G23-F estaba en la clase 3 y 10-O18-A estaba en clase 1.

Anticuerpos monoclonales	Clase de epítomo
10-O18-A	1
7-I1-B	2
2-C8-A	2

Anticuerpos monoclonales	Clase de epítipo
6-G23-F	3

Estos resultados demuestran que las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología se unen a tres epítipos distintos presentes en la proteína DLL3. Por consiguiente, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas divulgadas en el presente documento se pueden usar combinadas entre sí para administrar múltiples agentes terapéuticos a células tumorales que expresan DLL3.

Ejemplo 6: Mediciones de afinidad.

Se determinaron las afinidades de unión de los cuatro anticuerpos monoclonales (6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A), mediante interferometría de biocapa (BLI) usando el instrumento Octet HTX a 25 °C utilizando PBS al 0,1 % BSA al 0,02 % Tween 20 como el tampón de unión y Glicina 10 mM pH 1,7 como tampón de regeneración. Los cuatro anticuerpos monoclonales purificados (5 µg/ml de cada uno) se cargaron sobre sensores dirigidos contra Fc de ratón. Los sensores cargados se sumergieron en diluciones seriadas de Proteína DLL3 Humana Recombinante, (aminoácidos Ala27-Ala479, n.º de Cat. 9749-DL, R&D Systems) a una concentración inicial de 200 nM, con 7 diluciones en serie 1:3. Como se muestra en las **FIGS. 2A-2D**, la unión fue dependiente de la concentración. Se calcularon las constantes de disociación (K_D) usando un modelo de unión monovalente (1:1). Como se muestra en la **FIG. 2E**, todos los anticuerpos monoclonales tenían afinidades en el intervalo subnanomolar. La **FIG. 7** muestra que los anticuerpos monoclonales 6-G23-F, 10-O18-A, y 2-C8-A (mAbs) se unen selectivamente a DLL3, pero no a DLL1 o DLL4. El mAb 7-I1-B se une a DLL3 y DLL4, pero no a DLL1.

Estos resultados demuestran que las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología se unen específicamente a DLL3 con elevada afinidad. Por consiguiente, las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología son útiles en métodos para detectar la proteína DLL3 en una muestra biológica.

Ejemplo 7: Unión de anticuerpos monoclonales a células transfectadas y primarias.

Los cuatro anticuerpos monoclonales (6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A) se ensayaron para determinar su capacidad de unirse a la DLL3 de ratón y

macaco así como a la DLL3 humana endógena mediante citometría de flujo. Para este fin, se transfectaron células HEK293 con ADN plasmídico que codificaba DLL3 humana, de ratón o macaco de longitud completa y se usaron en el experimento. En resumen, se añadieron 10^6 células HEK293 transfectadas o

5 células NCI-H82 primarias en tampón FACS con PBS BSA al 0,5 % a los pocillos de una placa de fondo en U de 96 pocillos y se añadieron anticuerpos monoclonales a 10 $\mu\text{g/ml}$. Tras 30 minutos de incubación a 4 °C, se lavaron las células 3 veces en tampón FACS y se incubaron con un F(ab)2 marcado con PE dirigido contra las cadenas H y L de IgG de ratón con la 2ª etapa. Después de

10 otros 30 minutos de incubación a 4 °C, se lavaron las células tres veces en tampón FACS y se analizaron en el citómetro de flujo. Los datos se presentan como relación de la Intensidad fluorescente media para el anticuerpo monoclonal dividido por la tinción del fondo en la 2ª etapa. Como se muestra en la Tabla siguiente, todos los anticuerpos monoclonales reaccionaron en cruzado con

15 DLL3 de macaco y detectaron la DLL3 endógena en células NCI H82 pero solo 6-G23-F y 7-I1-B se unieron a DLL3 de ratón.

Anticuerpos monoclonales	293 hDLL3	293 DLL3 de macaco	293 mDLL3	293 (control negativo)	NCI-H82
6-G23-F	6,33	13,06	3,97	1,32	11,10
7-I1-B	9,74	18,67	4,70	1,46	19,21
10-O18-A	4,74	9,85	0,99	0,60	9,40
2-C8-A	7,71	15,03	1,50	0,59	11,89

Estos resultados demuestran que las composiciones relacionadas con inmunoglobulinas de la presente tecnología son útiles en métodos para detectar

20 la proteína DLL3 en una muestra biológica.

Ejemplo 8: Secuenciación.

Las cadenas pesada variable y ligera variable de los cuatro anticuerpos monoclonales se aislaron de los hibridomas correspondientes para 7-I1-B, 6-G23-F, 2-C8-A y 10-O18-A mediante RACE (Amplificación rápida de los

25 extremos de ADNc). Se aisló el ARN del hibridoma lisado con el kit RNeasy (Qiagen). Se aisló el ARNm durante la síntesis del ADNc y se generaron los productos de la PCR utilizando el kit RACE. A continuación se clonaron los productos de la PCR en un vector TOPO, se amplificaron por PCR y

posteriormente se aisló el gel para la secuenciación. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (V_H) y el dominio variable de cadena ligera (V_L) se muestran en la siguiente Tabla y las **FIGS. 3A-3D** (7-I1-B). **FIGS 4A-4D** (2-C8-A), **FIGS. 5A-5D** (10-O18-A) y **FIGS. 6A-6D** (6-G23-F).

5

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 1	Secuencia de nucleótidos de V _H de 7-I1-B	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGG GGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACT TTCAGTAACACCTGGATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTTGGCCGTATTAAGCAAATCTGAT GGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCG TGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGAT GATTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCC GTGTATTACTGTACCCAGTATTATTGGAA CTCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 2	Secuencia de aminoácidos de V _H de 7-I1-B	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SNTWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKSDG GTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS LKTEDTAVYYCTQYYWNSFDYWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 3	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _H de 7-I1-B	GFTFSNTW
SEQ ID NO: 4	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _H de 7-I1-B	IKSKSDGGTT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 5	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _H de 7-I1-B	TQYYWNSFDY
SEQ ID NO: 6	Secuencia de nucleótidos de V _L de 7-I1-B	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACA TTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGA TCTACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGG GTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGAT CTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATA TTACTGTCAACAGTATGATAATCTCCCGC TCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGA GATCAAA
SEQ ID NO: 7	Secuencia de aminoácidos de V _L de 7-I1-B	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCQASQDIS NYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQ YDNLPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 8	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _L de 7-I1-B	QASQDISNYLN
SEQ ID NO: 9	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _L de 7-I1-B	DASNLET
SEQ ID NO: 10	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _L de 7-I1-B	QQYDNLPLT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 11	Secuencia de nucleótidos de V _H de 2-C8-A	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCAGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAGTAGCTATTGGATGAACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCAACATAAAGGAAGATGGAAGT GAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TTACTGTGCGAGAGATCCGGGCTGGGCT CCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 12	Secuencia de aminoácidos de V _H de 2-C8-A	EVQLVESGGGLVQPGGSQRLSCAASGFTF SSYWMNWRQAPGKGLEWVANIKEDGSE KYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQGTTLVT VSS
SEQ ID NO: 13	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _H de 2-C8-A	GFTFSSY
SEQ ID NO: 14	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _H de 2-C8-A	KEDGSE
SEQ ID NO: 15	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _H de 2-C8-A	DPGWAPFDY

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 16	Secuencia de nucleótidos de V _L de 2-C8-A	GACATCCAGATGTCCCAGTCTCCATCCTC ACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGCAT TAGCAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGAT CTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGG GTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCGCCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTTCCCGT ACACTTTTGGCCAGGGGACCACGCTGGA GATCAAA
SEQ ID NO: 17	Secuencia de aminoácidos de V _L de 2-C8-A	DIQMSQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIS NYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPS KFSGSGSGTDFTLAISLQPEDFATYYCQQ YNSFPYTFGQGTLEIK
SEQ ID NO: 18	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _L de 2-C8-A	RASQGISNYLA
SEQ ID NO: 19	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _L de 2-C8-A	AASSLQS
SEQ ID NO: 20	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _L de 2-C8-A	QQYNSFPYT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 21	Secuencia de nucleótidos de V _H de 10-O18-A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCCA GGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGT CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTC CATCAATAGTTACTACTGGAGCTGGATCC GGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGT GGATTGGGTATATCTTTTACAGTGGGATC ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCG AGTCACCATATCATTAGACACGTCCAAGA ACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTG ACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACT GTGCGAGAATCGGCGTGGCTGGTTTTTA CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 22	Secuencia de aminoácidos de V _H de 10-O18-A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIN SYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIFYSGITNYN PSLKSRTVISLDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARIGVAGFYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 23	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _H de 10-O18-A	GGGINSY
SEQ ID NO: 24	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _H de 10-O18-A	FYSGL
SEQ ID NO: 25	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _H de 10-O18-A	IGVAGFYFDY

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 26	Secuencia de nucleótidos de V _L de 10-O18-A	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCA CCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGC CACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCA GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCA CTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAG TGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACC ATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC AGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTACCT CACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAA GGTGGAGATCAAA
SEQ ID NO: 27	Secuencia de aminoácidos de V _L de 10-O18-A	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGTSPITFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 28	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _L de 10-O18-A	RASQSVSSSYLA
SEQ ID NO: 29	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _L de 10-O18-A	GASSRAT
SEQ ID NO: 30	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _L de 10-O18-A	QQYGTSPIT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 31	Secuencia de nucleótidos de V _H de 6-G23-F	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTG AGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA GGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCT TCACCAGCTACTATATACACTGGGTGCGA CAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGA TGGGAATAATCGACCCAAGTGATGGTAG CACAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGC AGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCA CGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTAT TACTGTGCGAGAGATCGGGAATATAACTA CTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 32	Secuencia de aminoácidos de V _H de 6-G23-F	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWMGIIDPSDGST NYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCARDREYNYYGLDVWGQGTTV TVSS
SEQ ID NO: 33	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _H de 6-G23-F	GYTFTSY
SEQ ID NO: 34	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _H de 6-G23-F	DPSDGS
SEQ ID NO: 35	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _H de 6-G23-F	DREYNYYGLDV

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 36	Secuencia de nucleótidos de V _L de 6-G23-F	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTC CCTGCCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCC TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCT CGTATACCGTGATGGAAACACCTACTTGA ATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATC TCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTA ACCGGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATT CCGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTC ACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTG AGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAA GGTACACACTGGCCTCCGACGTTTCGGCC AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 37	Secuencia de aminoácidos de V _L de 6-G23-F	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLV YRDGNTYLNWFQQRPQGQSPRRLIYKVSNR DSGVPDRFRGSGSGTDFTLKISRVEADV GVYYCMQGTHWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 38	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V _L de 6-G23-F	RSSQSLVYRDGNTYLN
SEQ ID NO: 39	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V _L de 6-G23-F	KVSNRDS
SEQ ID NO: 40	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V _L de 6-G23-F	MQGTHWPPT

Ejemplo 9: Tratamiento de xenoinjertos de NCI-H209.

Se utilizarán para este estudio ratones hembra atímicos lampiños de ocho semanas de edad. Se harán crecer células tumorales NCI-H209 en el centro de la fase logarítmica en medio RPMI que contenía suero de feto de bovino al

10 %(FCS). Se cultivarán las células en matraces de cultivo de tejidos en una estufa incubadora a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ al 5 % y aire al 95 %. Los ratones recibirán un implante por vía subcutánea en el flanco derecho con 5×10^6 células tumorales NCI-H209 en matrigel al 50 % en un volumen total de 0,2 ml.

5 Ocho días después de la inoculación, los ratones se asignarán aleatoriamente a grupos cuando los tumores alcancen un volumen tumoral medio de aproximadamente 150 mm³. Se inyectarán los ratones en los días 8, 12 y 15 mediante inyección intraperitoneal tanto con IgG1 humana (1 o 10 mg/kg; n=5-15 ratones) como control negativo o uno o más conjugados de fármaco-anticuerpo de 6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A (1 o 10 mg/kg; n = 5-15 ratones). Se medirá el crecimiento tumoral.

Los conjugados de fármaco-anticuerpo de 6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A se prepararán utilizando los métodos conocidos en la bibliografía. Se divulgan algunos métodos en los Ejemplos 3-4 del presente documento. Uno o
15 más de una toxina proteica (por ejemplo, la toxina saporina, la exotoxina de pseudomonas y la toxina diftérica), un radionucleido, una antraciclina, un inhibidor de los microtúbulos, un inhibidor de la mitosis, un agente que daña el ADN, un análogo de nucleótido, un análogo de aminoácido, un análogo de vitamina se conjugarán con 6-G23-F, 2-C8-A, 7-I1-B y 10-O18-A para generar 6-
20 G23-F-ADC, 2-C8-A-ADC, 7-I1-B-ADC y 10-O18-A-ADC, respectivamente. Se utilizarán para este estudio ratones hembra atímicos lampiños de ocho semanas de edad. Se harán crecer células tumorales NCI-H209 en el centro de la fase logarítmica en medio RPMI que contenía suero de feto de bovino al 10 %(FCS). Se cultivarán las células en matraces de cultivo de tejidos en una estufa
25 incubadora a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ al 5 % y aire al 95 %. Los ratones recibirán un implante por vía subcutánea en el flanco derecho con 5×10^6 células tumorales NCI-H209 en matrigel al 50 % en un volumen total de 0,2 ml. Ocho días después de la inoculación, los ratones se asignarán aleatoriamente a grupos cuando los tumores alcancen un volumen tumoral medio de aproximadamente
30 150 mm³. Se inyectarán los ratones en los días 8, 12 y 15 mediante inyección intraperitoneal tanto con IgG1-ADC humana (0,11 o 1 mg/kg; n=5-15 ratones) como control negativo o uno o más de 6-G23-F-ADC, 2-C8-A-ADC, 7-I1-B-ADC o 10-O18-A-ADC (0,1 o 1 mg/kg; n = 5-15 ratones). Se medirá el crecimiento tumoral.

35 Estos resultados demostrarán que las composiciones relacionadas con

inmunoglobulinas de la presente tecnología son útiles en los métodos para tratar a un sujeto que padece un cáncer asociado a DLL3 (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma neuroendocrino macrocítico, cánceres neuroendocrinos pulmonares, cánceres neuroendocrinos extrapulmonares, cánceres neuroendocrinos extrapulmonares, o melanoma).

EQUIVALENTES

La presente tecnología no está limitada en términos de las realizaciones particulares descritas en la presente solicitud, que pretenden ser meras ilustraciones de aspectos individuales de la presente tecnología. Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones de esta presente tecnología sin apartarse de su espíritu y alcance, como resultará evidente para aquellos expertos en la materia. Métodos y aparatos funcionalmente equivalentes comprendidos en alcance de la presente tecnología, además de los citados en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de las descripciones anteriores. Dichas modificaciones y variaciones están destinadas a entrar dentro del alcance de presente tecnología. Debe entenderse que la presente tecnología no se limita a métodos particulares, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea una limitación.

Además, cuando las características o aspectos de la divulgación se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la materia reconocerán que la divulgación también se describe de esta manera en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Tal como entenderá el experto en la materia, para todos y cada uno de los fines, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos divulgados en este documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como lo suficientemente descriptivo y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como ejemplo no limitante, cada intervalo discutido en este documento puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. También comprenderá un experto en la materia que términos lingüísticos tales como "hasta", "al menos",

"mayor que", "menor que", y similares, incluyen el número citado y se refiere a los intervalos que posteriormente pueden desglosarse en subintervalos como se ha analizado anteriormente. Finalmente, tal como entenderá el experto en la materia, un intervalo incluye cada número individual. Por tanto, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 células se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 células. De forma similar, un grupo que tiene 1-5 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 células y así sucesivamente.

Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisionales y publicaciones a las que se hace referencia o se citan el presente documento se han incorporado como referencia en el presente documento en su totalidad, incluidas todas las figuras y tablas, en la medida que no sean incompatibles con las enseñanzas explícitas de la presente memoria descriptiva.