

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/28 (2013.01) **A61K 39/395** (2013.01)
A61P 37/00 (2013.01) **A61K 35/00** (2013.01)
A61P 21/00 (2013.01) **A61P 43/00** (2013.01)
C12N 15/13 (2013.01) **A61P 25/28** (2013.01)
C12N 15/73 (2013.01) **C12N 1/21** (2013.01)

(22) Data de pedido: **2008.06.03**

(30) Prioridade(s): **2007.06.04 US 933072 P**
2007.09.20 US 994646 P

(43) Data de publicação do pedido: **2010.02.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.08.21**
220/2013

(73) Titular(es):

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO CA
94080-4990

US

(72) Inventor(es):

YAN WU

US

CHRISTIAN W. SIEBEL

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA

PT

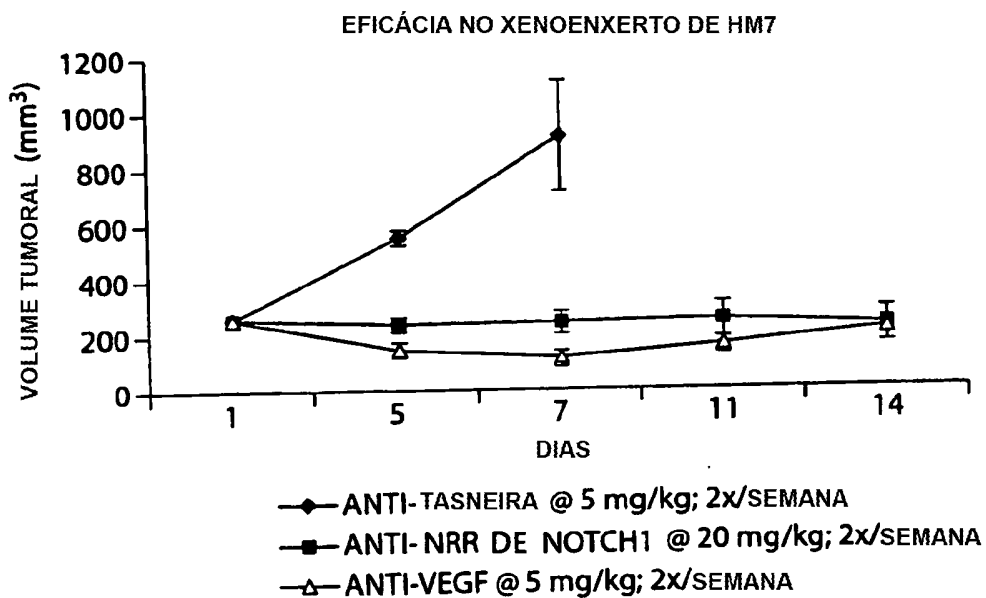
(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-NRR DE NOTCH1 E MÉTODOS UTILIZANDO OS MESMOS**

(57) Resumo:

O INVENTO PROPORCIONA ANTICORPOS ANTI-NRR DE NOTCH1 E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS MESMOS, E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DESTES ANTICORPOS.

RESUMO**"Anticorpos anti-NRR de Notch1 e métodos utilizando os mesmos"**

O invento proporciona anticorpos anti-NRR de Notch1 e composições compreendendo os mesmos, e métodos de utilização destes anticorpos.

Figura 15A

DESCRIÇÃO

"Anticorpos anti-NRR de Notch1 e métodos utilizando os mesmos"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se geralmente ao campo da biologia molecular. Mais especificamente, o invento refere-se a anticorpos anti-região reguladora negativa (NRR) de Notch1, e utilizações dos mesmos.

ANTECEDENTES DO INVENTO

A família dos receptores Notch é uma classe de receptores transmembranares evolutivamente conservados que transmitem sinais que afectam o desenvolvimento em organismos tão diversos como ouriços-do-mar e seres humanos. Tanto os receptores Notch como a sua família de ligandos Delta e Serrate (conhecidos como Jagged em mamíferos) são proteínas transmembranares com grandes domínios extracelulares que contêm repetições semelhantes às do factor de crescimento epidérmico (EGF). O número de parálogos Notch difere entre espécies. Por exemplo, existem quatro receptores Notch em mamíferos (Notch1 - Notch4), dois em *Caenorhabditis elegans* (LIN-12 e GLP-1) e um em *Drosophila melanogaster* (Notch). Os receptores Notch são proteoliticamente processados durante o transporte para a superfície celular através de uma protease semelhante a furina num local S1 externo ao domínio transmembranar, produzindo uma subunidade extracelular de Notch (ECN) e uma subunidade transmembranar de Notch (NTM). Estas duas subunidades permanecem associadas de forma não covalente e constituem o receptor da superfície celular heterodimérico maduro. As subunidades ECN de Notch1 contêm 36 repetições N-terminais semelhantes a EGF seguidas de três módulos de Repetições Lin 12/Notch repetidos em tandem (LNR) que precedem o local SI. Cada módulo de LNR contém três ligações dissulfureto e um grupo de resíduos ácidos e polares conservados que se prevê coordenem um ião de cálcio. Dentro da região de repetição de EGF residem locais de ligação para os ligandos de activação. Os módulos LNR, que compreendem um domínio único dos receptores Notch, participam na manutenção

de Notch numa conformação de repouso antes da activação induzida por ligando. A NTM de Notch1 compreende uma região extracelular (que ancora o local de clivagem S2), um segmento transmembranar (que ancora o local de clivagem S3), e uma grande parte intracelular que inclui um domínio RAM, repetições de anquirina, um domínio de transactivação e uma sequência carboxi-terminal PEST. A associação estável das subunidades ECN e NTM é dependente de um domínio de heterodimerização (HD) compreendendo a extremidade carboxi-terminal da ECN (designada HD-C) e a extremidade amino-terminal extracelular da NTM (designada HD-N). A ligação de um ligando Notch à subunidade ECN inicia duas clivagens proteolíticas sucessivas que ocorrem através de proteólise intramembranar regulada. A primeira clivagem através de uma metaloprotease no local S2 torna a subunidade transmembranar de Notch susceptível à segunda clivagem no local S3 próximo do folheto interno da membrana plasmática. A clivagem do local S3, que é catalisada por um complexo multiproteico contendo presenilina e nicastrina, liberta a porção intracelular da subunidade transmembranar de Notch, permitindo que se transloque para o núcleo e active a transcrição de genes alvo.

Cinco ligandos de Notch das classes semelhantes a Jagged e Delta foram identificados em humanos (Jagged1 (também designado Serrate1), Jagged2 (também designado Serrate2), Delta-like1 (também designado DLL1), Delta-like3 (também designado DLL3), e Delta-like4 (também designado DLL4)). Cada um dos ligandos é uma proteína transmembranar de passagem única com um motivo Delta, Serrate, LAG-2 (DSL) N-terminal conservado essencial para a ligação a Notch. Uma série de módulos semelhantes a EGF C-terminais ao motivo DSL precede o segmento que abrange a membrana. Ao contrário dos receptores Notch, os ligandos têm caudas citoplasmáticas curtas de 70-215 aminoácidos no terminal C. Além disso, outros tipos de ligandos têm sido relatados (p. ex., DNER, NB3 e F3/Contactina).

A via Notch funciona durante diversos processos de desenvolvimento e fisiológicos, incluindo os que afectam a neurogénese em moscas e vertebrados. Em geral, a sinalização por Notch está envolvida na inibição lateral, em decisões de

linhagem, e no estabelecimento de limites entre grupos de células (ver, p. ex., Bray, *Molecular Cell Biology* 7: 678-679, 2006). Mostrou-se que uma variedade de doenças humanas, incluindo cancros e distúrbios neurodegenerativos, resulta de mutações em genes codificando para receptores Notch ou seus ligandos (ver, p. ex., Nam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 501-509, 2002). A conexão entre sinalização por Notch não reprimida e malignidade foi reconhecida pela primeira vez quando uma translocação cromossómica recorrente t(7;9)(q34;q34.3) que cria uma variante truncada, constitutivamente activa de Notch1 humano foi identificada num subconjunto de leucemias linfoblásticas agudas humanas (T-ALL). Em modelos de ratinho, mostrou-se que a sinalização por Notch1 é essencial para o desenvolvimento das células T e que os sinais mediados por Notch1 promovem o desenvolvimento de células T em detrimento do desenvolvimento de células B. Também, em modelos de ratinho, a sinalização em excesso por Notch durante o desenvolvimento conduz a neoplasia de células T.

Além disso, os receptores Notch são expressos numa ampla variedade de cancros humanos e linhas celulares derivadas de tumores e promovem destinos neuronais em células estaminais embrionárias humanas. Por exemplo, Notch é altamente expresso em lesões neoplásicas no colo do útero humano e em células de carcinoma de células renais humanas. WO0020576 refere-se a anticorpos anti-Notch que se ligam a repetições semelhantes a EGF para tratamento de cancro. Dado o envolvimento da sinalização por Notch numa ampla variedade de doenças humanas, é evidente que continua a existir a necessidade de agentes que regulem a sinalização por Notch que tenham atributos clínicos que sejam óptimos para desenvolvimento como agentes terapêuticos. O invento aqui descrito satisfaz esta necessidade e proporciona outros benefícios.

SUMÁRIO DO INVENTO

O invento baseia-se em parte na identificação de uma variedade de anticorpos para a região reguladora negativa (NRR) de Notch1, e fragmentos destes. A NRR de Notch1 apresenta um alvo terapêutico importante e vantajoso, e o invento proporciona composições e utilizações médicas com

base na ligação a NRR de Notch1. Os anticorpos para NRR de Notch1 do invento, tal como aqui descrito, proporcionam importantes agentes terapêuticos e de diagnóstico para utilização no direccionamento de condições patológicas associadas a expressão e/ou actividade das vias de sinalização por Notch1. Por conseguinte, o invento proporciona métodos, composições, estojos, e artigos de fabrico relacionados com a ligação a NRR de Notch1.

O presente invento proporciona anticorpos, tais como definidos nas reivindicações, que se ligam a NRR de Notch1, em particular um anticorpo isolado que se liga a NRR de Notch1. Num aspecto particular, o invento apresenta um anticorpo anti-NRR de Notch1 isolado que se liga a NRR de Notch1 com uma K_d de 1×10^{-7} ou mais forte. Em concretizações desejáveis o anticorpo anti-NRR de Notch1 liga-se à NRR de Notch1 com uma K_d de 1×10^{-8} ou mais forte, ou uma K_d de 1×10^{-9} ou mais forte. Noutro aspecto, o invento proporciona um anticorpo isolado anti-NRR de Notch1, em que uma forma inteira de IgG do anticorpo se liga à NRR de Notch1 humana e de ratinho com uma K_d de 1×10^{-7} ou mais forte. Tal como é bem estabelecido na arte, a afinidade de ligação de um ligando ao seu receptor pode ser determinada utilizando qualquer um de uma variedade de ensaios, e expressa em termos de uma variedade de valores quantitativos. Por conseguinte, numa concretização, a afinidade de ligação é expressa como valores de K_d e reflecte a afinidade de ligação intrínseca (p. ex., com efeitos de avidéz minimizados). Em geral, e de preferência, a afinidade de ligação é medida *in vitro*, num contexto isento de células ou associado a células. Qualquer um de vários ensaios conhecidos na técnica, incluindo os aqui descritos, pode ser utilizado para obter medições de afinidade de ligação, incluindo, por exemplo, Biacore, radioimunoensaio (RIA), e ELISA.

Num aspecto, o invento apresenta um anticorpo isolado anti-NRR de Notch1 compreendendo:

(a) pelo menos uma, duas, três, quatro ou cinco sequências de regiões hipervariáveis (HVR) seleccionadas a partir de:

- (i) HVR-L1 compreendendo a sequência A1-A11, em que A1-A11 é RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:7)
 - (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência B1-B7, em que B1-B7 é SASFLYS (SEQ ID NO:8)
 - (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência C1-C9, em que C1-C9 é QQSYTTPPT (SEQ ID NO:9)
 - (iv) HVR-H1 compreendendo a sequência D1-D10, em que D1-D10 é GFTFSSYWIH (SEQ ID NO:1)
 - (v) HVR-H2 compreendendo a sequência E1-E18, em que E1-E18 é ARINPSNGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:2) e
 - (vi) HVR-H3 compreendendo a sequência F1-F14, em que F1-F14 é ARGSGFRWVMDY (SEQ ID NO:6); e
- (b) pelo menos uma HVR variante, em que a sequência da HVR variante compreende a modificação de pelo menos um resíduo da sequência representada em SEQ ID NOS:1-12. A modificação é desejavelmente uma substituição, inserção ou deleção.

Em concretizações desejáveis, uma variante de HVR-L3 compreende 1-4 (1, 2, 3 ou 4) substituições em qualquer combinação das seguintes posições: C3 (S ou F), C4 (Y ou F), C5 (T ou S), e C8 (P ou A ou S). Noutra concretização desejável, uma variante de HVR-H2 compreende 1-4 (1, 2, 3 ou 4) substituições em qualquer combinação das seguintes posições: E6 (S ou P ou A); E8 (G ou R); E10 (T ou A ou N); e E11 (N ou H ou Q ou R).

Noutro aspecto, um anticorpo anti-NRR de Notch1 isolado compreende uma, duas, três, quatro, cinco ou seis HVR, em que cada HVR compreende, consiste, ou consiste essencialmente numa sequência seleccionada a partir de SEQ ID NOS:1-12, e em que SEQ ID NO:7 corresponde a uma HVR-L1, SEQ ID NO:8 corresponde a uma HVR-L2, SEQ ID NO:9, 10, 11, ou 12 corresponde a uma HVR-L3, SEQ ID NO:1 corresponde a uma HVR-H1, SEQ ID NO:2, 3, 4, ou 5 corresponde a uma HVR-H2, e SEQ ID NO:6 corresponde a uma HVR-H3.

Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo tal como definido nas reivindicações compreendendo uma região HVR-H1 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:1. Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo compreendendo uma região HVR-H2 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:2, 3, 4 ou 5.

Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo compreendendo uma região HVR-H3 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:6. Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo compreendendo uma HVR-L3 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:10, 11, ou 12.

Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo tal como definido nas reivindicações compreendendo pelo menos uma, pelo menos duas, pelo menos três, ou todas as quatro das seguintes:

(i) uma sequência de HVR-H1 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:1;

(ii) uma sequência de HVR-H2 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:2, 3, 4, ou 5;

uma sequência de HVR-H3 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:6;

uma sequência de HVR-L3 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:10, 11 ou 12.

Numa concretização desejável, o anticorpo compreende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, e HVR-H3, em que cada um, por ordem, contém SEQ ID NO:7, 8, 9, 1, 2, 6. Noutra concretização desejável, o anticorpo compreende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, e HVR-H3, em que cada um, por ordem, compreende SEQ ID NO:7, 8, 10, 1, 3, 6. Ainda noutra concretização desejável, o anticorpo compreende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, e HVR-H3, em que cada um, por ordem, compreende SEQ ID NO:7, 8, 11, 1, 4, 6. Ainda noutra concretização desejável, o anticorpo compreende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, e HVR-H3, em que cada um, por ordem, compreende SEQ ID NO:7, 8, 12, 1, 5, 6.

As sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs:1-12 estão numeradas em relação à HVR individual (i.e., H1, H2 ou H3) tal como indicado na Figura 1, sendo a numeração de acordo com o sistema de numeração de Kabat, tal como descrito abaixo.

O invento proporciona um anticorpo anti-NRR de Notch1 isolado que inibe, reduz, e/ou bloqueia a sinalização por Notch1. Alguns anticorpos compreendem um domínio variável da cadeia leve do anticorpo 4D5 humanizado (huMAb4D5-8)

(HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (também referido em Pat. U.S. No. 6407213 e Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5): 1073-1093) tal como ilustrado em SEQ ID NO:53 abaixo.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
Ile Lys 107 (SEQ ID NO:53) (os resíduos de HVR estão sublinhados)

Num aspecto, a sequência do domínio variável da cadeia leve huMAb4D5-8 é modificada numa ou mais das posições 30, 66, e 91 (Asn, Arg, e His tal como indicado a negrito/itálico acima, respectivamente). Num aspecto particular, a sequência modificada de huMAb4D5-8 compreende Ser na posição 30, Gly na posição 66, e/ou Ser na posição 91. Por conseguinte, num aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência representada em SEQ ID NO:54 abaixo:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Ser TyrThr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
Ile Lys 107 (SEQ ID NO:54) (os resíduos de HVR estão sublinhados)

Os resíduos substituídos em relação a huMAb4D5-8 estão indicados a negrito/itálico.

Os anticorpos do invento podem compreender qualquer sequência adequada da estrutura do domínio variável, desde que a actividade de ligação a NRR de Notch1 seja substancialmente retida. Por exemplo, nalgumas concretizações, os anticorpos do invento compreendem uma sequência de consenso da estrutura da cadeia pesada do

subgrupo III humana. Numa concretização destes anticorpos, a sequência de consenso da estrutura compreende uma substituição na posição 71, 73 e/ou 78. Nalgumas concretizações destes anticorpos, a posição 71 é A, 73 é T e/ou 78 é A. Num aspecto estes anticorpos compreendem sequências da estrutura do domínio variável da cadeia pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (também referido nas Patentes U.S. Nos. 6407213 & 5821337, e Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5): 1073-1093). Numa concretização, estes anticorpos compreendem ainda uma sequência de consenso da estrutura de cadeia leve κI humana. Num aspecto particular estes anticorpos compreendem sequências de HVR da cadeia leve de huMAb4D5-8 tal como descrito nas Patentes U.S. Nos. 6407213 & 5821337. Num aspecto estes anticorpos compreendem sequências de domínio variável de cadeia leve de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (também referido nas Patentes U.S. Nos. 6407213 & 5821337, e Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5): 1073-1093).

Num aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, e/ou 37, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 2, e/ou 6, respectivamente. Noutro aspecto, a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, e/ou 37, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 3, e/ou 6, respectivamente. Ainda noutro aspecto, a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, e/ou 37, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 4, e/ou 6, respectivamente. Num outro aspecto a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, e/ou 37, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 5, e/ou 6, respectivamente.

Num aspecto particular um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 38, 39, 40,

e/ou 41, e as sequências de HVR L1, L2, e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 9, respectivamente. Noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 38, 39, 40, e/ou 41, e as sequências de HVR L1, L2, e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 10, respectivamente. Num aspecto adicional um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 38, 39, 40, e/ou 41, e as sequências de HVR L1, L2, e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 11, respectivamente. Ainda noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 38, 39, 40, e/ou 41, e as sequências de HVR L1, L2, e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 12, respectivamente.

Noutro aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 42, 43, 44, e/ou 45, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 2, e/ou 6, respectivamente. Num aspecto adicional um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 42, 43, 44, e/ou 45, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 3, e/ou 6, respectivamente. Num outro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 42, 43, 44, e/ou 45, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 4, e/ou 6, respectivamente. Ainda noutro aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 42, 43, 44, e/ou 45, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 5, e/ou 6, respectivamente.

Num aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 15, 16, 17, e/ou 18, e as sequências de HVR L1, L2 e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 9, respectivamente. Noutro aspecto, um anticorpo do invento compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS:

15, 16, 17, e/ou 18, e as sequências de HVR L1, L2 e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 10, respectivamente. Ainda noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 15, 16, 17, e/ou 18, e as sequências de HVR L1, L2 e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 11, respectivamente. Num outro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência de SEQ ID NOS: 15, 16, 17, e/ou 18, e as sequências de HVR L1, L2 e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 12, respectivamente.

Num aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende as sequências de SEQ ID NOS: 42, 43, 47, e/ou 45, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 2, e/ou 6, respectivamente. Num aspecto adicional, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende as sequências de SEQ ID NOS: 42, 43, 47, e/ou 45, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 3, e/ou 6, respectivamente. Noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende as sequências de SEQ ID NOS: 42, 43, 47, e/ou 45, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 4, e/ou 6, respectivamente. Num outro aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende as sequências de SEQ ID NOS: 42, 43, 47, e/ou 45, e as sequências de HVR H1, H2, e H3 são SEQ ID NOS: 1, 5, e/ou 6, respectivamente.

Num aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende as sequências de SEQ ID NOS: 15, 16, 47, e/ou 18, e as sequências de HVR L1, L2 e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 9, respectivamente. Noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende as sequências de SEQ ID NOS: 15, 16, 47, e/ou 18, e as sequências de HVR L1, L2 e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 10, respectivamente. Ainda noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende as sequências de SEQ

ID NOS: 15, 16, 47, e/ou 18, e as sequências de HVR L1, L2 e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 11, respectivamente. Num outro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende as sequências de SEQ ID NOS: 15, 16, 47, e/ou 18, e as sequências de HVR L1, L2 e L3 são SEQ ID NOS: 7, 8, e/ou 12, respectivamente.

Ainda num outro aspecto, um anticorpo é maturado por afinidade para se obter a afinidade de ligação ao alvo, desejada. Num exemplo, um anticorpo afinidade maturada compreende substituição numa ou mais das posições de aminoácidos H53, H55, H57, H58, L91, e L96. Num exemplo, um anticorpo de afinidade maturada compreende uma ou mais das seguintes substituições: (a) na cadeia pesada, S53P, S53A, G55R, T57A, T57N, N58H, N58Q, e N58R ou (b), na cadeia leve, S91F, P96A, e P96S.

Noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de SEQ ID NO:58. Num aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de SEQ ID NO:59. Num aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de SEQ ID NO:58 e um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de SEQ ID NO:59. Noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de SEQ ID NO:60. Num aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de SEQ ID NO:61. Num aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de SEQ ID NO:60 e um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de SEQ ID NO:61. Noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de SEQ ID NO:62. Num aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 63. Num aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de SEQ ID NO:62 e um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de SEQ ID NO:63. Noutro aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência

de SEQ ID NO:64. Num aspecto, um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de SEQ ID NO:65. Num aspecto um anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de SEQ ID NO:64 e um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de SEQ ID NO:65.

Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo que compete com qualquer um dos anticorpos acima mencionados pela ligação a NRR de Notch1. Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo que se liga ao mesmo ou a um epitopo semelhante na NRR de Notch1 tal como qualquer um dos anticorpos acima mencionados.

Tal como é conhecido na técnica, e tal como descrito em maior pormenor aqui abaixo, a posição/limite de aminoácido delineando uma região hipervariável de um anticorpo pode variar, dependendo do contexto e das várias definições conhecidas na técnica (tal como descrito abaixo). Algumas posições dentro de um domínio variável podem ser vistas como posições hipervariáveis híbridas por estas posições poderem ser consideradas como estando dentro de uma região hipervariável sob um conjunto de critérios ao mesmo tempo que são consideradas como estando fora de uma região hipervariável sob um conjunto de critérios diferente. Uma ou mais destas posições podem também ser verificadas em regiões hipervariáveis estendidas (tal como melhor definido abaixo).

Nalguns aspectos, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Noutros aspectos, o anticorpo é um anticorpo policlonal. Nalguns aspectos, o anticorpo é seleccionado a partir do grupo que consiste num anticorpo quimérico, um anticorpo de afinidade maturada, um anticorpo humanizado, e um anticorpo humano. Em certos aspectos, o anticorpo é um fragmento de anticorpo. Nalguns aspectos, o anticorpo é um Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ ou scFv.

Num aspecto o anticorpo é um anticorpo quimérico, por exemplo, um anticorpo compreendendo sequências de ligação ao antigénio de um dador não humano enxertado com uma sequência heteróloga não humana, humana, ou humanizada (p. ex., sequências de estrutura e/ou domínio constante). Num aspecto

o dador não humano é um ratinho. Num outro aspecto, uma sequência de ligação ao antigénio é sintética, p. ex., obtida a partir de mutagénese (p. ex., pesquisa de apresentação fágica, etc.). Num aspecto particular um anticorpo quimérico do invento tem regiões V de murídeo e uma região C humana. Num aspecto, a região V da cadeia leve de murídeo é fundida com uma cadeia leve capa humana. Noutro aspecto a região V da cadeia pesada de murídeo é fundida com uma região C de IgG1 humana.

Os anticorpos humanizados do invento incluem os que têm substituições de aminoácidos na região de estrutura (FR) e variantes de afinidade maturada com alterações nas CDR enxertadas. Os aminoácidos substituídos na CDR ou FR não estão limitados aos presentes no anticorpo dador ou receptor. Noutros aspectos, os anticorpos compreendem ainda alterações em resíduos de aminoácidos na região Fc que conduzem a uma função efectora melhorada incluindo maior função de CDC e/ou ADCC e morte de células B. Outros anticorpos incluem aqueles possuindo alterações específicas que melhoram a estabilidade. Noutros aspectos, os anticorpos do invento compreendem alterações em resíduos de aminoácidos na região Fc que conduzem a menor função efectora, p. ex., diminuição da função de CDC e/ou ADCC e/ou menor morte de células B. Nalguns aspectos, os anticorpos são caracterizados por menor ligação (tal como ausência de ligação) ao factor Clq do complemento humano e/ou ao receptor de Fc humano em células assassinas naturais (NK). Nalguns aspectos os anticorpos são caracterizados por menor ligação (tal como ausência de ligação) a FcγRI, FcγRIIA, e/ou FcγRIIIA humanos. Nalguns aspectos, os anticorpos são da classe IgG (p. ex., IgG1 ou IgG4) e compreendem pelo menos uma mutação em E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331, e/ou P329 (numeração de acordo com o índice EU). Nalguns aspectos, os anticorpos compreendem as mutações L234A/L235A ou D265A/N297A.

Também aqui proporcionados são polipéptidos anti-NRR de Notch1 compreendendo qualquer uma das sequências de ligação ao antigénio aqui proporcionadas, em que os polipéptidos anti-NRR de Notch1 se ligam especificamente a uma NRR de Notch1, p. ex., uma NRR de Notch1 humana ou de ratinho.

Os anticorpos do invento ligam-se (por exemplo ligam-se especificamente) a NRR de Notch1. Nalguns aspectos, podem modular um ou mais aspectos da sinalização por Notch1 e/ou destruição de qualquer via biológica de Notch1 e/ou ligando de Notch1 biologicamente relevante, e/ou tratamento e/ou prevenção de um tumor, distúrbio proliferativo celular ou um cancro; e/ou tratamento ou prevenção de um distúrbio associado a expressão e/ou actividade de Notch1 (tal como maior expressão e/ou actividade de Notch1). O anticorpo de NRR de Notch1 liga-se especificamente a uma NRR de Notch1 humana ou de ratinho. Nalgumas concretizações, o anticorpo liga-se especificamente a Notch1 com uma Kd de 1×10^{-7} ou mais forte. Nalgumas concretizações, o anticorpo do invento reduz, inibe, e/ou bloqueia a actividade de Notch1 *in vivo* e/ou *in vitro*.

Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo do invento para utilização num método para tratamento de cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalgumas concretizações, o distúrbio é uma doença neurodegenerativa. Ainda noutras concretizações desejáveis, o distúrbio é uma condição patológica associada a angiogénese. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalgumas concretizações, a condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

Num aspecto, o invento proporciona composições compreendendo um ou mais anticorpos do invento e um transportador que é farmacologicamente aceitável.

Noutro aspecto, o invento proporciona ácidos nucleicos codificando um anticorpo anti-NRR de Notch1 do invento.

Ainda noutro aspecto, o invento proporciona vectores compreendendo um ácido nucleico do invento.

São também proporcionadas composições compreendendo um ou mais ácidos nucleicos do invento e um transportador. Num aspecto o transportador é farmacologicamente aceitável.

Num aspecto, o invento proporciona células hospedeiras compreendendo um ácido nucleico ou um vector do invento. Um vector pode ser de qualquer tipo, por exemplo, um vector recombinante tal como um vector de expressão. Qualquer uma de uma variedade de células hospedeiras pode ser utilizada. Numa concretização, uma célula hospedeira é uma célula procariótica, por exemplo, *E. coli*. Noutra concretização, uma célula hospedeira é uma célula eucariótica, por exemplo uma célula de mamífero tal como uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO).

Num outro aspecto, o invento proporciona métodos de produção de um anticorpo do invento. Por exemplo, o invento proporciona métodos de produção de um anticorpo anti-NRR de Notch1 (que, tal como aqui definido, inclui anticorpos inteiros e fragmentos destes), o referido método compreendendo a expressão numa célula hospedeira adequada de um vector recombinante do invento codificando o anticorpo (ou fragmento deste), e a recuperação do anticorpo.

É também aqui proporcionado um artigo de fabrico compreendendo um recipiente; e uma composição contida dentro do recipiente, em que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-NRR de Notch1. Num aspecto, a composição compreende um ácido nucleico. Noutro aspecto, uma composição compreendendo um anticorpo compreende ainda um transportador, que nalguns aspectos é farmacologicamente aceitável. Num aspecto, um artigo de fabrico compreende ainda instruções para administração da composição (p. ex., o anticorpo) a um indivíduo (tais como instruções para qualquer um dos métodos aqui descritos).

É também proporcionado um estojo compreendendo um primeiro recipiente compreendendo uma composição compreendendo um ou mais anticorpos anti-NRR de Notch1; e um segundo recipiente compreendendo um tampão. Num aspecto, o tampão é farmacologicamente aceitável. Num aspecto, uma composição compreendendo um anticorpo compreende ainda um transportador, que nalguns aspectos é farmacologicamente aceitável. Noutros aspectos, um estojo compreende ainda instruções para administração da composição (p. ex., o anticorpo) a um indivíduo.

Num outro aspecto, o invento proporciona a utilização de um anticorpo anti-NRR de Notch1 do invento para utilização num método de tratamento de cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalgumas concretizações, o distúrbio é uma neuropatia ou doença neurodegenerativa. Ainda noutros aspectos desejáveis, o distúrbio é uma condição patológica associada a angiogénese. Nalguns aspectos a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalgumas concretizações, a condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

É também divulgada a utilização de um ácido nucleico na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou a distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos o distúrbio é uma neuropatia ou doença neurodegenerativa. Ainda noutros aspectos desejáveis, o distúrbio é uma condição patológica associada a angiogénese. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

É também divulgada a utilização de um vector de expressão na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou a distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos, o distúrbio é uma neuropatia ou doença neurodegenerativa. Ainda noutros aspectos desejáveis, o distúrbio é uma condição patológica associada a angiogénese. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

É também divulgada a utilização de uma célula hospedeira na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um

tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos, o distúrbio é uma neuropatia ou doença neurodegenerativa. Ainda noutros aspectos desejáveis, o distúrbio é uma condição patológica associada a angiogénese. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

É também divulgada a utilização de um artigo de fabrico na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos, o distúrbio é uma neuropatia ou doença neurodegenerativa. Ainda noutros aspectos desejáveis, o distúrbio é uma condição patológica associada a angiogénese. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou a distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

É também divulgada a utilização de um estojo na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos o distúrbio é uma neuropatia ou doença neurodegenerativa. Ainda noutros aspectos desejáveis, o distúrbio é uma condição patológica associada a angiogénese. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos, a condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

O invento proporciona métodos e composições úteis para a modulação de distúrbios associados à expressão e/ou sinalização de Notch1, uma tal expressão e/ou sinalização aumentada ou expressão e/ou sinalização indesejada.

O invento proporciona também métodos e composições úteis para modulação de distúrbios associados a receptores Notch1 activados. Tais distúrbios podem estar associados a uma translocação ou uma mutação de activação numa sequência de aminoácidos de Notch1. Distúrbios exemplares associados a receptores Notch1 activados incluem leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL).

Num aspecto, o invento proporciona anticorpos para utilização em métodos para tratamento de um tumor, um cancro, e/ou a distúrbio proliferativo celular associado a expressão e/ou actividade aumentada de Notch1 num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo. Numa concretização o tumor, cancro, e/ou distúrbio proliferativo celular envolve uma mutação activadora de Notch1.

São também proporcionados métodos para matar uma célula (tal como uma célula de cancro ou tumoral) num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo.

Noutro aspecto, o invento proporciona anticorpos para utilização em métodos para redução, inibição, bloqueio, ou prevenção do crescimento de um tumor ou cancro num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo.

Noutro aspecto, o invento proporciona anticorpos para utilização em métodos para redução, inibição, bloqueio, ou prevenção de angiogénese num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo.

Noutro aspecto, o invento proporciona métodos para tratamento de uma condição patológica associada a angiogénese num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo. Nalgumas concretizações, a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalgumas concretizações, a

condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

Num outro aspecto, o invento proporciona anticorpos para utilização em métodos para tratamento de uma doença neurodegenerativa. São também proporcionados métodos para reparação de uma célula nervosa danificada ou distúrbios que resultem numa desconexão dos axónios e/ou desmielinização num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo.

São também proporcionados métodos para promoção do desenvolvimento, da proliferação, da manutenção ou regeneração de neurónios num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo.

São também proporcionados métodos para aumento de uma resposta imunitária a um antigénio num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo. Nalguns aspectos, um antigénio para o qual é desejada uma resposta imunitária é administrado em simultâneo com o anticorpo anti-NRR de Notch1. São também proporcionados métodos de aumento de uma resposta imunitária a um antigénio num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1; e em que a composição é administrada ao indivíduo de modo a que o anticorpo agonista anti-NRR de Notch1 seja apresentado a células imunitárias (tais como células T) do invento durante ou pouco após a iniciação das células imunitárias (tais como células T), pelo antigénio, aumentando assim a resposta imunitária. Nalguns aspectos, o antigénio é de um cancro.

São também proporcionados métodos para promoção de regeneração e/ou reparação de tecidos, tais como a regeneração de músculo esquelético ou cardíaco ou osso num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1 ao indivíduo.

São também proporcionados métodos para redução, inibição, bloqueio, ou prevenção de uma resposta imunitária a um antigénio num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1 ao indivíduo. Num aspecto, a resposta imunitária é um distúrbio imunológico devido ao desenvolvimento ou regulação anormal de células T.

São também proporcionados métodos para tratamento de um distúrbio auto-imune num indivíduo, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1 ao indivíduo. Nalguns aspectos, o distúrbio auto-imune é diabetes auto-imune, esclerose múltipla, rejeição de transplantes, ou artrite reumatóide.

Os anticorpos do invento podem ser utilizados para afectar qualquer estado patológico adequado. Distúrbios exemplares são aqui descritos e incluem um cancro seleccionado a partir do grupo consistindo em cancro do pulmão de células pequenas, cancro do cérebro (p. ex., neuroblastoma ou meningioma), cancro da pele (p. ex., melanoma, carcinoma de células basais, ou carcinoma de células escamosas), carcinoma da mama, cancro gástrico, cancro colorrectal (CRC), carcinoma hepatocelular, cancro cervical, cancro do pulmão, cancro pancreático, cancro da próstata e malignidades hematológicas (p. ex., leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), leucemia mielogénica aguda (AML), linfoma de Hodgkin, e mieloma múltiplo).

Numa concretização, uma célula que é alvejada por um anticorpo do invento é uma célula de cancro. Por exemplo, uma célula de cancro pode ser uma seleccionada a partir do grupo que consiste numa célula de cancro da mama, uma célula de cancro colorrectal, uma célula de cancro do pulmão, uma célula de carcinoma papilar, uma célula de cancro do cólon, uma célula de cancro pancreático, uma célula de cancro do ovário, uma célula de cancro do colo do útero, uma célula de cancro do sistema nervoso central, uma célula de sarcoma osteogénico, uma célula de carcinoma renal, uma célula de carcinoma hepatocelular, uma célula de cancro da bexiga, uma

célula de carcinoma gástrico, uma célula de carcinoma escamoso da cabeça e do pescoço, uma célula de melanoma, uma célula de leucemia, e uma célula de adenoma do cólon. Num aspecto, uma célula que é alvejada num método do invento é uma célula hiperproliferativa e/ou hiperplásica. Noutro aspecto, uma célula que é apontada num método do invento é uma célula displásica. Ainda noutro aspecto, a célula que é alvejada num método do invento é uma célula metastática.

Os métodos do invento podem ainda compreender passos de tratamento adicionais. Por exemplo, um método compreende ainda um passo em que uma célula e/ou tecido alvejado (p. ex., uma célula de cancro) é exposta a tratamento de radiação ou um agente quimioterapêutico.

Num aspecto, o invento proporciona métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 em combinação com uma quantidade eficaz de outro agente terapêutico (tal como um agente anti-angiogénese, outro anticorpo, um agente quimioterapêutico, um agente citotóxico, um agente imunossupressor, um pró-fármaco, uma citocina, radioterapia citotóxica, um corticosteróide, um antiemético, uma vacina de cancro, um analgésico, ou um agente inibidor do crescimento). Por exemplo, anticorpos anti-NRR de Notch1 são utilizados em combinações com um agente anticancro ou um agente anti-angiogénico para tratar várias condições neoplásicas ou não neoplásicas. Em exemplos particulares, os anticorpos anti-NRR de Notch1 são utilizados em combinação com tamoxifeno, letrozole, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib ou trastuzumab.

O anticorpo anti-NRR de Notch1 pode ser administrado em série ou em combinação com o outro agente terapêutico que é eficaz para esses fins, na mesma composição ou como composições separadas. A administração do anticorpo anti-NRR de Notch1 e do outro agente terapêutico (p. ex., agente anticancro) pode ser feita simultaneamente, p. ex., como uma única composição ou como duas ou mais composições distintas, utilizando a mesma ou diferentes vias de administração. Alternativamente, ou adicionalmente, a administração pode ser

feita sequencialmente, por qualquer ordem. Alternativamente, ou adicionalmente, os passos podem ser realizados como uma combinação de ambos sequencialmente e simultaneamente, por qualquer ordem. Em certos aspectos, intervalos variando de minutos a dias, a de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações das duas ou mais composições. Por exemplo, o agente anticâncer pode ser administrado primeiro, seguido pelo anticorpo anti-NRR de Notch1. No entanto, a administração simultânea ou administração do anticorpo anti-NRR de Notch1 primeiro está também contemplada. Em certos aspectos, intervalos variando de minutos a dias, a de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações das duas ou mais composições.

Em certos aspectos, o invento proporciona anticorpos para utilização num método de tratamento de um distúrbio (tal como um tumor, um câncer, e/ou um distúrbio proliferativo celular) através da administração de quantidades eficazes de um anticorpo anti-NRR de Notch1 e/ou um ou mais inibidores de angiogênese e um ou mais agentes quimioterapêuticos. Uma variedade de agentes quimioterapêuticos pode ser utilizada nos métodos de tratamento combinados do invento. Uma lista exemplificativa e não limitativa de agentes quimioterapêuticos contemplados é aqui proporcionada em "Definições". A administração do anticorpo anti-NRR de Notch1 e do agente quimioterapêutico pode ser feita simultaneamente, p. ex., como uma composição única ou como duas ou mais composições distintas, utilizando a mesma via ou vias de administração diferentes. Alternativamente, ou adicionalmente, a administração pode ser feita sequencialmente, por qualquer ordem. Alternativamente, ou adicionalmente, os passos podem ser realizados como uma combinação tanto de sequencialmente como simultaneamente, por qualquer ordem. Em certos aspectos, intervalos variando de minutos a dias, a de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações das duas ou mais composições. Por exemplo, o agente quimioterapêutico pode ser administrado primeiro, seguido do anticorpo anti-NRR de Notch1. No entanto, a administração simultânea ou a administração do anticorpo anti-NRR de Notch1 primeiro está também contemplada. Por conseguinte, num aspecto, o invento proporciona métodos compreendendo a administração de um

anticorpo anti-NRR de Notch1, seguido de administração de um agente quimioterapêutico. Em certos aspectos, intervalos variando de minutos a dias, a de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações das duas ou mais composições.

São também proporcionados métodos para a detecção de Notch1, os métodos compreendendo a detecção do complexo Notch1-anticorpo anti-NRR de Notch1 na amostra. O termo "detecção" tal como aqui utilizado inclui detecção qualitativa e/ou quantitativa (níveis de medição) com ou sem referência a um controlo.

São também proporcionados métodos para diagnóstico de um distúrbio associado a expressão e/ou actividade de Notch1, os métodos compreendendo a detecção do complexo Notch1-anticorpo anti-NRR de Notch1 numa amostra biológica de um indivíduo possuindo ou suspeito de possuir o distúrbio. Nalguns aspectos, a expressão de Notch1 é expressão aumentada ou expressão anormal. Nalguns aspectos, o distúrbio é um tumor, cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular.

São também proporcionados métodos para tratamento de um indivíduo possuindo um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular através da administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo, ainda mais em que a expressão de Notch1 e/ou a expressão de ligando de Notch1 é detectada na amostra biológica do indivíduo antes, durante, ou após a administração de um anticorpo anti-NRR de Notch1. Nalguns aspectos, a amostra biológica é do cancro, tumor, e/ou distúrbio proliferativo celular. Nalguns aspectos é detectada sobre-expressão de Notch1 antes, durante, e/ou após a administração de um anticorpo anti-NRR de Notch1. Nalguns aspectos, a expressão de ligando de Notch1 é detectada antes, durante, e/ou após a administração de um anticorpo anti-NRR de Notch1. A expressão pode ser detectada antes; durante; após; antes e durante; antes e após; durante e após; ou antes, durante, e após a administração de um anticorpo anti-NRR de Notch1.

São também proporcionados métodos para tratamento de um indivíduo possuindo um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular através da administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo, em que a amostra biológica do cancro, tumor, e/ou distúrbio celular ou distúrbio hepático expressa Notch1 ou ligando de Notch1.

São também proporcionados métodos para selecção do tratamento para um indivíduo, os métodos compreendendo: (a) detecção da expressão de Notch1 ou expressão do ligando de Notch1, se houver, numa amostra biológica de um indivíduo; e (b) subsequente ao passo (a), selecção do tratamento para o indivíduo, em que a selecção do tratamento é baseada na expressão do Notch1 ou ligando de Notch1 detectada no passo (a). Nalguns aspectos, é detectada expressão aumentada de Notch1 ou ligando de Notch1 na amostra biológica do indivíduo relativamente a um valor de referência ou amostra de controlo. Nalguns aspectos, é detectada expressão diminuída de Notch1 ou ligando de Notch1 na amostra biológica do indivíduo relativamente a um valor de referência ou amostra de controlo no indivíduo. Nalguns aspectos, a expressão de Notch1 ou ligando de Notch1 é detectada e é seleccionado o tratamento com um anticorpo anti-Notch1. Nalguns aspectos, o indivíduo tem um tumor, cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular.

Nalguns aspectos envolvendo detecção, a expressão de Notch1 compreende a detecção da deleção do gene, amplificação do gene, e/ou mutação do gene de Notch1. Nalguns aspectos envolvendo detecção, a expressão do ligando de Notch1 compreende a detecção da deleção do gene, amplificação do gene, e/ou mutação do gene de Notch1.

São aqui descritas amostras biológicas, p. ex., na definição de Amostra Biológica. Nalguns aspectos, a amostra biológica é soro ou de um tumor.

Em aspectos envolvendo detecção da expressão de Notch1 e/ou ligando de Notch1 (p. ex., Jagged1, Jagged2, Delta-like1, Delta-like3, e/ou Delta-like4), pode ser detectada a expressão do polinucleótido de Notch1 e/ou ligando de Notch1,

e/ou a expressão do polipéptido de Notch1 e/ou ligando de Notch1. Nalguns aspectos envolvendo detecção de Notch1 e/ou ligando de Notch1, é detectada a expressão de ARNm de Notch1 e/ou ligando de Notch1. Noutros aspectos, é detectada a expressão do polipéptido Notch1 e/ou ligando de Notch1 utilizando um agente anti-NRR de Notch1 e/ou um agente anti-ligando de Notch1. Nalguns aspectos, a expressão do polipéptido de Notch1 e/ou ligando de Notch1 é detectada utilizando um anticorpo. Qualquer anticorpo adequado pode ser utilizado para detecção e/ou diagnóstico, incluindo anticorpos monoclonais e/ou policlonais, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo de afinidade maturada, um anticorpo humanizado, e/ou um fragmento de anticorpo. Nalguns aspectos, um anticorpo anti-NRR de Notch1 aqui descrito é utilizado para detecção. Nalgumas concretizações, a expressão do polipéptido de Notch1 e/ou ligando de Notch1 é detectada utilizando imuno-histoquímica ("IHC"). Nalguns aspectos, a expressão de Notch1 é registada a 2 ou mais utilizando um ensaio de IHC.

Nalguns aspectos envolvendo detecção de expressão de Notch1 e/ou ligando de Notch1, pode ser detectada a presença e/ou ausência e/ou o nível de expressão de Notch1 e/ou ligando de Notch1. A expressão de Notch1 e/ou ligando de Notch1 pode estar aumentada. Entende-se que a ausência de expressão de Notch1 e/ou ligando de Notch1 inclui níveis insignificantes ou mínimos. Nalguns aspectos, a expressão de Notch1 na amostra biológica de teste é superior à observada para uma amostra biológica de controlo (ou nível de expressão de controlo ou referência). Nalguns aspectos, a expressão de Notch1 é pelo menos de cerca de 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 75 vezes, 100 vezes, 150 vezes maior, ou maior na amostra biológica de teste que na amostra biológica de controlo. Nalguns aspectos, a expressão do polipéptido de Notch1 é determinada num ensaio imuno-histoquímico ("IHC") para registar pelo menos 2 ou mais para intensidade de coloração. Nalguns aspectos, a expressão do polipéptido de Notch1 é determinada num ensaio IHC para registar pelo menos 1 ou mais, ou pelo menos 3 ou mais para intensidade de coloração. Nalguns aspectos, a expressão de Notch1 na amostra biológica de teste é menor que a observada

para uma amostra biológica de controlo (ou nível de expressão de controlo).

Noutro aspecto, proporciona qualquer um dos anticorpos anti-NRR de Notch1 aqui descritos, podendo compreender um marcador detectável.

É também proporcionado um complexo de qualquer um dos anticorpos anti-NRR de Notch1 aqui descritos e Notch1. Nalguns aspectos, o complexo é *in vivo* ou *in vitro*. Nalguns aspectos o complexo compreende uma célula de cancro. Nalguns aspectos, o anticorpo anti-NRR de Notch1 é marcado de forma detectável.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIGURAS 1-1 e 1-2: Sequências da volta de HVR da cadeia pesada e cadeia leve de anticorpos anti-NRR de Notch1. As figuras mostram as sequências de HVR da cadeia pesada, H1, H2, e H3, e sequências de HVR da cadeia leve, L1, L2, e L3. A numeração das sequências é como se segue: Anticorpo **A** (HVR-H1 é SEQ ID NO:1; HVR-H2 é SEQ ID NO:2; HVR-H3 é SEQ ID NO:6; HVR-L1 é SEQ ID NO:7; HVR-L2 é SEQ ID NO:8; HVR-L3 é SEQ ID NO:9); Anticorpo **A-1** (HVR-H1 é SEQ ID NO:1; HVR-H2 é SEQ ID NO:3; HVR-H3 é SEQ ID NO:6; HVR-L1 é SEQ ID NO:7; HVR-L2 é SEQ ID NO:8; HVR-L3 é SEQ ID NO:10); Anticorpo **A-2** (HVR-H1 é SEQ ID NO:1; HVR-H2 é SEQ ID NO:4; HVR-H3 é SEQ ID NO:6; HVR-L1 é SEQ ID NO:7; HVR-L2 é SEQ ID NO:8; HVR-L3 é SEQ ID NO:11); e Anticorpo **A-3** (HVR-H1 é SEQ ID NO:1; HVR-H2 é SEQ ID NO:5; HVR-H3 é SEQ ID NO:6; HVR-L1 é SEQ ID NO:7; HVR-L2 é SEQ ID NO:8; HVR-L3 é SEQ ID NO:12). As posições dos aminoácidos são numeradas de acordo com o sistema de numeração de Kabat tal como descrito abaixo.

FIGURA 2: representa as sequências de aminoácidos das regiões variáveis da cadeia pesada e regiões variáveis da cadeia leve dos Anticorpos **A**, **A-1**, **A-2**, e **A-3** (SEQ ID NOS:58-65).

As FIGURAS 3A, 3B, e 4 representam sequências de estrutura de consenso humanas aceitadoras exemplares para

utilização na prática do presente invento, com os identificadores de sequência como se segue:

Estruturas de consenso da pesada variável (Fig. 3A, 3B)
estrutura de consenso subgrupo I de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO:19)
estrutura de consenso subgrupo I de VH humana menos regiões hipervariáveis estendidas (SEQ ID NOS:20-22)
estrutura de consenso subgrupo II de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO:23)
estrutura de consenso subgrupo II de VH humana menos regiões hipervariáveis estendidas (SEQ ID NOS:24-26)
estrutura de consenso subgrupo II de VH humana menos estendidas
estrutura de consenso subgrupo III de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO:27)
estrutura de consenso subgrupo III de VH humana menos regiões hipervariáveis estendidas (SEQ ID NOS:28-30)
estrutura aceitadora de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO:31)
estrutura aceitadora de VH humana menos regiões hipervariáveis estendidas (SEQ ID NOS:32-33)
estrutura 2 aceitadora de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO:34)
estrutura 2 aceitadora de VH humana menos regiões hipervariáveis estendidas (SEQ ID NOS:35-37)

Estruturas de consenso da leve variável (VL) (FIG. 4)
estrutura de consenso subgrupo I de VL capa humana (SEQ ID NO:38)
estrutura de consenso subgrupo II de VL capa humana (SEQ ID NO:39)
estrutura de consenso subgrupo III de VL capa humana (SEQ ID NO:40)
estrutura de consenso subgrupo IV de VL capa humana (SEQ ID NO: 41)

A FIGURA 5 representa sequências da região de estrutura das cadeias leves (SEQ ID NOS:15-18) e pesadas (SEQ ID NOS:42-45) de huMAb4D5-8. Os números em sobrescrito/negrito indicam posições de aminoácidos de acordo com Kabat.

A FIGURA 6 representa sequências modificadas/variantes da região de estrutura das cadeias leves (SEQ ID NOS:15, 16,

18, e 46) e pesadas (SEQ ID NOS:42, 43, 45, e 47) de huMAb4D5-8. Números em sobrescrito/negrito indicam posições de aminoácidos de acordo com Kabat.

A FIGURA 7 é um gráfico mostrando que o Anticorpo **A** é um potente inibidor de Notch1 medido utilizando um gene repórter de luciferase. Em cada coluna A-L, as células receptoras foram NIH-3T3-Notch1. Em A, a célula do ligando foi NIH-3T3-Parental e em B-L, a célula do ligando foi NIH-3T3-Jag1. Em A, B, e K, não foi adicionado anticorpo ou Composto E (um inibidor da gama-secretase); em C, foi adicionado um anticorpo de controlo do isotipo a 400 ng/ml; em D, foi adicionado Anticorpo **A** a 16 ng/ml; em E, foi adicionado Anticorpo **A** a 80 ng/ml; em F, foi adicionado Anticorpo **A** a 400 ng/ml; em G, foi adicionado Anticorpo **A** a 2000 ng/ml; em H, foi adicionado Anticorpo **A** a 400 ng/ml; em I, foi adicionado Anticorpo **A** a 400 ng/ml; em J, foi adicionado um anticorpo de controlo do isotipo a 400 ng/ml; em K, foi adicionado DMSO a 0,01%; e em L, foi adicionado Composto E a 1 μ M em DMSO a 0,01%. Em H, a proteína NRR de Notch1 foi adicionada a 5 μ g/ml (100 μ l); em I, foi adicionada proteína BSA (Albumina de Soro Bovino) a 6,5 μ g/ml (100 μ l); em J, foi adicionada proteína NRR de Notch1 a 5 μ g/ml (100 μ l); em A-G, K, e L, não foi adicionada proteína.

A FIGURA 8 é um gráfico mostrando que Anticorpos A, A-1, A-2, e A-3 inibem Notch1, medido utilizando um ensaio repórter de luciferase. As barras negras mostram os resultados obtidos utilizando o anticorpo original Anticorpo **A** e as outras barras mostram os resultados obtidos utilizando Anticorpo **A-1** (riscas horizontais), Anticorpo **A-2** (sombreamento a cinzento) e Anticorpo **A-3** (riscas diagonais). Tal como revelado a 80 ng/ml de anticorpo, os Anticorpos **A-1** e **A-2** mostraram um bloqueio mais potente do sinal de Notch1 que o Anticorpo **A** original. O eixo dos XX do gráfico representa a concentração de anticorpo (ng/ml) e o eixo dos YY do gráfico representa a luminescência da luciferase do pirilampo/renilla.

A FIGURA 9 é um gráfico mostrando que o Anticorpo **A** alivia o bloqueio da diferenciação de miócitos C2C12 de ratinho causado pela activação de sinalização por Notch. Em

A-F, o meio foi meio de diferenciação. Em A, os mioblastos C2C12 de ratinho não foram co-cultivados com células NIH-3T3 expressando o ligando Jagged1, enquanto em B-F, os mioblastos C2C12 de ratinho foram co-cultivados com células NIH-3T3 expressando o ligando Jagged1. O anticorpo/tratamento adicionado às células foi como se segue: nenhum para A e B, de controlo do isotipo para C, Anticorpo **A** a 200 ng/ml para D, DMSO para E, e Composto E a 1 μ M para F.

As FIGURAS 10A - 10F são imagens de miócitos C2C12 de ratinho corados com MHC/Alexa[®] 488 (fila de cima) ou DAPI (cloridrato de 4',6'-diamidino-2-fenilindol; fila de baixo). Para A-F, o meio foi meio de diferenciação. Em A, os mioblastos C2C12 de ratinho não foram co-cultivados com células NIH-3T3 expressando o ligando Jagged1, enquanto em B-F, os mioblastos C2C12 de ratinho foram co-cultivados com células NIH-3T3 expressando o ligando Jagged1. O anticorpo/tratamento adicionado às células foi como se segue: nenhum para A e B, de controlo do isotipo para C, Anticorpo **A** a 200 ng/ml para D, DMSO para E, e Composto E a 1 μ M para F.

As FIGURAS 11-1 a 11-4 são um alinhamento das sequências de aminoácidos de Notch1 humano e de ratinho (SEQ ID NOS:56 e 57). A ferramenta de alinhamento SIM (disponível no sítio da web ExpASY) foi utilizada para alinhar as sequências completas de proteínas Notch1 humanas e de murídeo. Os parâmetros por defeito foram escolhidos, com uma penalidade de intervalo aberto de 12, uma penalidade de extensão de 4 e BLOSUM62 como matriz de comparação. Os domínios proteicos estão sublinhados e marcados. Os limites do péptido sinal, do domínio transmembranar e EGF foram baseados em Vardar *et al.* (*Biochemistry*, 42: 7061-7067, 2003); os limites de HD-N e HD-C foram baseados em Malecki *et al.* (*Mol. Cell Biol.* 26: 4642-4651, 2006). A Região Reguladora Negativa (NRR) corresponde a sequências que começam em LNR_A e terminam após HD-C. As sequências imunogénio utilizadas para gerar anticorpos de NRR de Notch1 estão sobrelinhadas com uma linha tracejada e incluem 34-36 repetições de EGF mais a NRR. Abreviaturas: Os aminoácidos são mostrados no código de uma letra; TM, transmembranar; EGF, repetições do factor de crescimento epidérmico; LNR, repetições Lin12-Notch; HD-N, domínio de heterodimerização - no lado amino-terminal do local de

clivagem S1; HD-C, domínio de heterodimerização - no lado carboxi-terminal do local de clivagem S1; S1, local de clivagem S1 para furina-proteases; S2, local de clivagem S2 para ADAM-proteases (família da Disintegrina A e Metaloproteases).

As FIGURAS 12A-12C são gráficos mostrando os resultados das experiências de mapeamento de epitopo para o Anticorpo **A** (Figura 12A), Anticorpo **A-1** (Figura 12B), e Anticorpo **A-2** (Figura 12C).

A FIGURA 13 é um gráfico mostrando que os anticorpos Anti-NRR de Notch1 inibem a sinalização de receptores Notch1 de tipo selvagem e mutantes. As barras negras a cheio mostram os resultados obtidos utilizando um anticorpo de controlo a 2000 ng/ml; as barras com pontos grosseiros mostram os resultados obtidos utilizando Anticorpo **A** a 80 ng/ml; as barras com riscas finas mostram os resultados obtidos utilizando Anticorpo **A** a 400 ng/ml; as barras com riscas grossas mostram os resultados obtidos utilizando Anticorpo **A** a 2000 ng/ml; as barras com riscas cruzadas mostram os resultados obtidos utilizando Composto E a 10 μ M; e as barras com pontos finos mostram os resultados obtidos utilizando DMSO (o veículo para o Composto E). Os resultados para cada condição foram medidos em oito replicados e depois expressos como o valor médio com barras de erro indicando o desvio padrão.

A FIGURA 14A é uma série de imagens mostrando que o tratamento anti-NRR de Notch1 e anti-D114 causa um aumento notável no surgimento e comprimento de vasos num ensaio de surgimento de células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana). Os resultados são mostrados para células tratadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato) como controlo ou com Anticorpo anti-NRR de Notch1 **A** ou **A-2**.

A FIGURA 14B é uma série de imagens mostrando o efeito de anticorpos anti-NRR de Notch1 na vascularização e angiogénese utilizando um ensaio de bolsa da córnea. O tratamento anti-NRR de Notch1 (Anticorpo **A-2**) aumentou significativamente a densidade da rede vascular.

A FIGURA 14C é uma série de imagens mostrando o efeito do tratamento anti-D114 e anti-NRR de Notch1 no fluxo através de vasos num ensaio da córnea. A perfusão através de vasos tratados tanto com anti-D114 como anti-NRR de Notch1 foi restringida.

A FIGURA 14D é uma série de imagens mostrando o efeito de anticorpos anti-NRR de Notch1 num modelo de angiogénese de retina de ratinho. O tratamento com anticorpo anti-NRR de Notch1 (Anticorpo **A-2**) aumentou a densidade da vasculatura e gerou um fenótipo de hipersurgimento.

A FIGURA 14E é uma série de imagens mostrando que, num modelo de angiogénese de retina de ratinho, o tratamento com anti-NRR de Notch1 (Anticorpo **A-2**) causa um aumento no número de núcleos, que é consistente com um aumento na proliferação de células.

A FIGURA 15A é um gráfico mostrando o efeito de anticorpo anti-NRR de Notch1 no crescimento tumoral num modelo de ratinho *in vivo*. O tratamento com Anticorpo anti-NRR de Notch1 **A-2** parou o crescimento tumoral.

A FIGURA 15B é um gráfico mostrando que várias doses de Anticorpo anti-NRR de Notch1 **A-2** paravam ou atrasavam o crescimento tumoral num modelo de ratinho *in vivo*.

A FIGURA 15C é um gráfico mostrando que, num modelo de ratinho *in vivo*, o Anticorpo anti-NRR de Notch1 **A-2** diminuiu o volume tumoral.

A FIGURA 15D é um gráfico mostrando que, num modelo de ratinho *in vivo*, o Anticorpo anti-NRR de Notch1 **A-2** causa perda de peso de um modo dependente da dose.

A FIGURA 15E é um gráfico mostrando a eliminação do Anticorpo anti-NRR de Notch1 **A-2** ao longo do tempo nos soros de ratinhos imunodeficientes (Balb-C Nu/Nu).

As FIGURAS 16A e 16B são uma série de imagens mostrando exemplos de criptas intestinais em vilosidades do intestino delgado (Figura 16A) ou grosso (Figura 16B) de ratinhos

tratados com um anticorpo de controlo (veículo) ou com Anticorpo anti-NRR de Notch1 **A-2** a uma concentração de 10 mg/kg.

A FIGURA 17 é um gráfico mostrando que anticorpos anti-NRR de Notch1 e inibidores de gama-secretase diminuem a viabilidade de certas linhas de células de cancro. Foi utilizado Anticorpo anti-NRR de Notch1 **A-2** e os inibidores de gama-secretase éster t-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina (DAPT) e Composto E (CmpE). As linhas de células de cancro estão indicadas no eixo dos xx.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O invento aqui proporciona anticorpos anti-NRR de Notch1 tal como definido nas reivindicações que são úteis para, p. ex., tratamento ou prevenção de estados de doença associados a expressão e/ou actividade de Notch, tal como expressão e/ou actividade aumentada ou expressão e/ou actividade indesejada. Nalgumas concretizações, os anticorpos do invento são utilizados para tratar um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular.

Os anticorpos anti-NRR de Notch1 podem ser úteis como reagentes para detecção e/ou isolamento de Notch1, tal como detecção de Notch1 em vários tecidos e tipos celulares.

O invento proporciona ainda métodos de produção de anticorpos anti-NRR de Notch1, e polinucleótidos codificando anticorpos anti-NRR de Notch1.

Técnicas gerais

As técnicas e procedimentos descritos ou referenciados aqui são em geral bem entendidos e vulgarmente empregues utilizando metodologia convencional pelos peritos na técnica, tal como, por exemplo, as metodologias amplamente utilizadas descritas em Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 3^a edição (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY" (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); a

série "METHODS IN ENZYMOLOGY" (Academic Press, Inc.): "PCR 2: A PRACTICAL APPROACH" (M. J. MacPherson, B. D. Hames E G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow E Lane, eds. (1988) "ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL", e "ANIMAL CELL CULTURE" (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definições

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com utilizações de diagnóstico ou terapêuticas do anticorpo e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. De preferência, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo, conforme determinado através do método de Lowry, e de maior preferência mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácidos N-terminal ou interna utilizando um sequenciador de copo rotativo, ou (3) até à homogeneidade através de SDS-PAGE (electroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida), sob condições redutoras ou não redutoras utilizando coloração de azul de Coomassie ou, de preferência, de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Vulgarmente, no entanto, o anticorpo isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está normalmente associada na fonte natural do ácido nucleico. Uma molécula de ácido nucleico isolada está noutra forma que não na forma ou configuração na qual se encontra na natureza. Moléculas de ácido nucleico isoladas são, portanto, distinguidas da molécula de ácido nucleico tal como existe em células naturais. No entanto, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que expressam normalmente o ácido nucleico (por exemplo, um ácido nucleico codificando anticorpo) em que, por

exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossômica diferente da das células naturais.

O termo "numeração dos resíduos do domínio variável como em Kabat" ou "numeração das posições de aminoácidos como em Kabat" e variações destes, referem-se ao sistema de numeração utilizado para domínios variáveis de cadeias pesadas ou domínios variáveis de cadeias leves da compilação de anticorpos em Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeração, a sequência de aminoácidos linear real pode conter menos aminoácidos ou aminoácidos adicionais correspondentes a um encurtamento de, ou inserção em, uma FR ou CDR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável da cadeia pesada pode incluir uma única inserção de aminoácidos (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de H2 e os resíduos inseridos (p. ex., resíduos 82a, 82b e 82c, etc., de acordo com Kabat) após o resíduo 82 da FR da cadeia pesada. A numeração de resíduos de Kabat pode ser determinada para um dado anticorpo através de alinhamento nas regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat "padrão".

A frase "substancialmente semelhante", ou "substancialmente a mesma", tal como aqui utilizado, denota um grau de semelhança suficientemente elevado entre dois valores numéricos (geralmente um associado a um anticorpo do invento e o outro associado a um anticorpo de referência/comparação) de modo a que um perito na técnica considerará a diferença entre os dois valores como de pouca ou nenhuma importância biológica e/ou estatística dentro do contexto da característica biológica medida pelos referidos valores (p. ex., valores de Kd). A diferença entre os referidos dois valores é de preferência inferior a cerca de 50%, de preferência inferior a cerca de 40%, de preferência inferior a cerca de 30%, de preferência inferior a cerca de 20%, de preferência inferior a cerca de 10% em função do valor para o anticorpo de referência/comparação.

"Afinidade de ligação" refere-se em geral à força da soma total de interações não covalentes entre um único local

de ligação de uma molécula (p. ex., um anticorpo) e o seu parceiro de ligação (p. ex., um antigénio). Salvo indicação em contrário, tal como é aqui utilizado, "afinidade de ligação" refere-se à afinidade de ligação intrínseca que reflecte uma interacção 1:1 entre membros de um par de ligação (p. ex., anticorpo e antigénio). A afinidade de uma molécula X para o seu parceiro Y pode em geral ser representada pela constante de dissociação (K_d). Desejavelmente a K_d é de 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , ou mesmo 1×10^{-10} ou mais forte. A afinidade pode ser medida através de métodos comuns conhecidos na técnica, incluindo os aqui descritos. Os anticorpos de baixa afinidade ligam-se geralmente ao antigénio lentamente e tendem a dissociar-se rapidamente, enquanto os anticorpos de alta afinidade ligam-se geralmente ao antigénio mais rapidamente e tendem a permanecer mais tempo ligados. Uma variedade de métodos de medição da afinidade de ligação é conhecida na técnica, qualquer um dos quais pode ser usado para os fins do presente invento.

Numa concretização, a " K_d " ou o "valor de K_d " é medido através de um ensaio de ligação ao antigénio radiomarcado (RIA) realizado com a versão Fab de um anticorpo de interesse e o seu antigénio tal como descrito pelo seguinte ensaio que mede a afinidade de ligação de Fabs em solução para o antigénio através do equilíbrio de Fab com uma concentração mínima de antigénio marcado com (^{125}I), na presença de uma série de titulação de antigénio não marcado e depois captura do antigénio ligado com uma placa revestida com anticorpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 865-881). Para estabelecer as condições para o ensaio, placas de microtitulação (Dynex) são revestidas de um dia para o outro com 5 $\mu\text{g/ml}$ de um anticorpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) em carbonato de sódio 50 mM (pH 9,6), e subsequentemente bloqueadas com albumina de soro bovino a 2% (p/v) em PBS durante duas a cinco horas à temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Numa placa não adsorvente (Nunc #269620), 100 pM ou 26 pM de antigénio- ^{125}I são misturados com diluições em série de um Fab de interesse (p. ex., consistente com a avaliação de um anticorpo anti-VEGF, Fab-12, em Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599). O Fab de interesse é então incubado de um dia para o outro; no

entanto, a incubação pode continuar durante um período mais longo (p. ex., 65 horas) para assegurar que o equilíbrio é alcançado. Depois disso, as misturas são transferidas para a placa de captura para incubação à temperatura ambiente (p. ex., durante uma hora). A solução é então removida e a placa lavada oito vezes com Tween-20 a 0,1% em PBS. Após as placas terem secado, são adicionados 150 μ l/poço de cintilante (MicroScint-20, Packard), e as placas são contadas num contador gama Topcount (Packard) durante dez minutos. As concentrações de cada Fab que dão menos ou igual a 20% da ligação máxima são escolhidas para utilização em ensaios de ligação competitiva. De acordo com outro aspecto, a K_d ou o valor de K_d é medido utilizando ensaios de ressonância de plasmão de superfície utilizando um BIAcore™-2000 ou um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C com chips de antigénio imobilizado CM5 a ~10 unidades de resposta (RU). Resumidamente, chips biossensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) são activados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O antigénio é diluído com acetato de sódio 10 mM, pH 4,8, em 5 μ g/ml (~0,2 μ M) antes da injeção a um caudal de 5 μ l/minuto para atingir aproximadamente 10 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Após a injeção do antigénio, é injectada etanolamina 1 M para bloquear os grupos que não reagiram. Para as medições da cinética, diluições em série de duas vezes do Fab (0,78 nM a 500 nM) são injectadas em PBS com Tween 20 a 0,05% (PBST) a 25°C, a um caudal de aproximadamente 25 μ l/min. As taxas de associação (k_{on}) e taxas de dissociação (k_{off}) são calculadas utilizando um modelo de ligação um-para-um de Langmuir simples (BIAcore Evaluation Software versão 3.2) através do ajuste simultâneo do sensorgrama de associação e dissociação. A constante de dissociação em equilíbrio (K_d) é calculada como a razão de k_{off}/K_{on} . Ver, p. ex., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 865-881. Se a taxa "on" exceder $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ através do ensaio de ressonância de plasmão de superfície acima, então a taxa "on" pode ser determinada usando uma técnica de extinção de fluorescência que mede o aumento ou a diminuição da intensidade de emissão de fluorescência (excitação = 295 nm, emissão = 340 nm, passa-banda de 16 nm) a 25°C de um

anticorpo anti-antigénio 20 nM (forma Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes de antigénio medidas num espectrómetro, tal como um espectrofotómetro equipado com paragem de fluxo (Aviv Instruments) ou um espectrofotómetro SLM-Aminco série 8000 (ThermoSpectronic) com uma cuvete vermelha agitada.

Uma "taxa on" ou "taxa de associação" ou " k_{on} " pode também ser determinada com a mesma técnica de ressonância de plasmão de superfície descrita acima utilizando um BIAcore™-2000 ou um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C com chips de antigénio imobilizado CM5 a ≈ 10 unidades de resposta (RU). Resumidamente, chips biossensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) são activados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O antigénio é diluído com acetato de sódio 10 mM, pH 4,8, em 5 $\mu\text{g/ml}$ ($\approx 0,2 \mu\text{M}$) antes da injeção a um caudal de 5 $\mu\text{l/minuto}$ para atingir aproximadamente 10 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Após a injeção do antigénio, é injectada etanolamina 1 M para bloquear os grupos que não reagiram. Para medições da cinética, são injectadas diluições em série de duas vezes de Fab (0,78 nM a 500 nM) em PBS com Tween 20 a 0,05% (PBST) a 25°C a um caudal de aproximadamente 25 $\mu\text{l/min}$. As taxas de associação (k_{on}) e as taxas de dissociação (k_{off}) são calculadas utilizando um modelo de ligação de um para um de Langmuir simples (BIAcore Evaluation Software versão 3.2) através de ajuste simultâneo do sensorgrama de associação e dissociação. A constante de dissociação em equilíbrio (K_d) foi calculada como a razão k_{off}/k_{on} . Ver, p. ex., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 865-881. No entanto, se a taxa "on" exceder $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ através do ensaio de ressonância de plasmão de superfície acima, então a taxa "on" é de preferência determinada através da utilização de uma técnica de extinção de fluorescência que mede o aumento ou a diminuição na intensidade de emissão de fluorescência (excitação = 295 nm; emissão = 340 nm, passa-banda de 16 nm) a 25°C de um anticorpo anti-antigénio 20 nM (forma Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes de antigénio conforme medido num espectrómetro, tal como um espectrofotómetro equipado com paragem de fluxo (Aviv

Instruments) ou um espectrofotómetro SLM-Aminco série 8000 (ThermoSpectronic) com uma cuvete agitada.

O termo "vector," tal como aqui utilizado, pretende referir-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vector é um "plasmídeo", que se refere a uma volta de ADN circular de cadeia dupla na qual podem estar ligados mais fragmentos de ADN. Outro tipo de vector é um vector fágico. Outro tipo de vector é um vector viral, em que mais segmentos de ADN podem ser ligados no genoma viral. Certos vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira em que são introduzidos (p. ex., vectores bacterianos possuindo uma origem de replicação bacteriana e vectores de mamífero epissómicos). Outros vectores (p. ex., vectores de mamífero não epissómicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após introdução na célula hospedeira, e são deste modo replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vectores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão operativamente ligados. Tais vectores são aqui referidos como "vectores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vectores recombinantes"). Em geral, os vectores de expressão de utilidade nas técnicas de ADN recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. No presente fascículo, "plasmídeo" e "vector" podem ser utilizados alternadamente uma vez que o plasmídeo é a forma mais vulgarmente utilizada de vector.

"Polinucleótido", ou "ácido nucleico", como aqui utilizados alternadamente, referem-se a polímeros de nucleótidos de qualquer comprimento, e incluem ADN e ARN. Os nucleótidos podem ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos ou bases modificados, e/ou seus análogos, ou qualquer substrato que possa ser incorporado num polímero através de ADN ou ARN-polimerase, ou através de uma reacção de síntese. Um polinucleótido pode compreender nucleótidos modificados, tais como nucleótidos metilados e seus análogos. Se presente, a modificação da estrutura nucleotídica pode ser conferida antes ou após a montagem do polímero. A sequência de nucleótidos pode ser interrompida por componentes não nucleótidos. Um polinucleótido pode ser adicionalmente modificado após a síntese, tal como por

conjugação com um marcador. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "protecções", substituição de um ou mais dos nucleótidos de ocorrência natural por um análogo, modificações internucleotídicas tais como, por exemplo, aquelas com ligações sem carga (p. ex., fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) e com ligações com carga (p. ex., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquelas contendo porções pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (p. ex., nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos sinal, poli-L-lisina, etc.), aquelas com intercaladores (p.ex., acridina, psoraleno, etc.), aquelas contendo quelantes (p. ex., metais, metais radioactivos, boro, metais oxidativos, etc.), aquelas contendo alquiladores, aquelas com ligações modificadas (p.ex., ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), bem como formas não modificadas do ou dos polinucleótidos. Além disso, qualquer um dos grupos hidroxilo normalmente presente nos açúcares pode ser substituído, por exemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegido por grupos protectores padrão ou activado para preparar ligações adicionais a nucleótidos adicionais, ou pode ser conjugado com suportes sólidos ou semi-sólidos. O OH terminal 5' e 3' pode ser fosforilado ou substituído com aminas ou porções de grupos de protecção orgânicos de 1 a 20 átomos de carbono. Outros hidroxilos podem também ser derivados para grupos de protecção padrão. Os polinucleótidos podem também conter formas análogas de açúcares ribose ou desoxirribose que são geralmente conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- ou 2'-azido-ribose, análogos de açúcar carbocíclicos, açúcares alfa-anoméricos, açúcares epiméricos tais como arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares piranose, açúcares furanose, sedo-heptuloses, análogos acíclicos e análogos de nucleósidos básicos tais como metil-ribósido. Uma ou mais ligações fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativos. Estes grupos de ligação alternativos incluem, mas não se limitam a, concretizações em que o fosfato é substituído por $P(O)S$ ("tioato"), $P(S)S$ ("ditioato"), $(O)NR_2$ ("amidato"), $P(O)R$, $P(O)OR'$, CO ou CH_2 ("formacetal"), em que cada R ou R' é independentemente H ou alquilo substituído ou não substituído (I-20 C) opcionalmente contendo uma ligação éter ($-O-$), arilo, alcenilo, cicloalquilo, cicloalcenilo ou araldilo. Nem todas as

ligações num polinucleótido precisam de ser idênticas. A descrição anterior aplica-se a todos os polinucleótidos aqui referidos, incluindo ARN e ADN.

"Oligonucleótido", como é aqui utilizado, refere-se em geral a polinucleótidos curtos, geralmente de cadeia simples, geralmente sintéticos, que têm geralmente, mas não necessariamente, menos do que cerca de 200 nucleótidos de comprimento. Os termos "oligonucleótido" e "polinucleótido" não são mutuamente exclusivos. A descrição acima para polinucleótidos é igualmente e totalmente aplicável a oligonucleótidos.

"Percentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos", em relação a uma sequência peptídica ou polipeptídica é definida como a percentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência peptídica ou polipeptídica específica, após alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para alcançar a percentagem máxima de identidade de sequência, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da percentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode ser alcançado de vários modos que estão dentro da perícia na técnica, por exemplo, utilizando programas de computador publicamente disponíveis tais como o programa BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os peritos na técnica podem determinar os parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para conseguir o alinhamento máximo ao longo do comprimento total das sequências a comparar. Para os fins daqui, no entanto, os valores de % de identidade de sequência de aminoácidos são gerados utilizando o programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2, em que o código-fonte completo para o programa ALIGN-2 é fornecido na Tabela A abaixo. O programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2 é da autoria de Genentech, Inc. e o código-fonte foi apresentado com a documentação do utilizador no U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde está registado sob o N° de Registo U.S. Copyright TXU510087. O programa ALIGN-2 está disponível ao público através de

Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia ou pode ser compilado a partir do código-fonte proporcionado em, por exemplo, W02007/001851. O programa ALIGN-2 deve ser compilado para uso num sistema operativo UNIX, de preferência UNIX V4.0D digital. Todos os parâmetros de comparação de sequências são definidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações onde ALIGN-2 é empregue para comparações de sequências de aminoácidos, a % de identidade de sequência de aminoácidos de uma dada sequência de aminoácidos A para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B (que pode ser alternativamente expressa como uma dada sequência de aminoácidos A que tem ou compreende uma certa % de identidade de sequência de aminoácidos para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B) é calculada como se segue:

100 vezes a fracção X/Y

em que X é o número de resíduos de aminoácidos registados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 nesse alinhamento de A e B pelo programa, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será apreciado que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % de identidade de sequência de aminoácidos de A para B não será igual à % de identidade de sequência de aminoácidos de B para A.

Desejavelmente, duas ou mais sequências de aminoácidos são pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90% idênticas. Mais desejavelmente, duas ou mais sequências de aminoácidos são pelo menos 95%, 97%, 98%, 99% ou mesmo 100% idênticas. A menos que especificamente mencionado em contrário, todos os valores da % de identidade de sequência de aminoácidos aqui utilizados são obtidos tal como descrito no parágrafo imediatamente anterior utilizando o programa de computador ALIGN-2.

O termo "Notch1", tal como aqui utilizado, refere-se, a menos que especificamente ou contextualmente indicado em contrário, a qualquer polipéptido de Notch1 nativo ou variante (quer nativo quer sintético). O termo "sequência

nativa" engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural (p. ex., uma sequência de domínio extracelular, ou uma sequência da subunidade transmembranar), formas variantes de ocorrência natural (p. ex., formas de processamento alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural. O termo "Notch1 de tipo selvagem" refere-se geralmente a um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma proteína Notch1 de ocorrência natural. O termo "sequência de Notch1 de tipo selvagem" refere-se geralmente a uma sequência de aminoácidos verificada num Notch1 de ocorrência natural.

O termo "ligando de Notch1", tal como aqui utilizado, refere-se, a menos que especificamente ou contextualmente indicado em contrário, a qualquer polipéptido de ligando de Notch1 nativo ou variante (quer nativo quer sintético) (por exemplo, Jagged1, Jagged2, Delta-like1, Delta-like3, e/ou Delta-like4). O termo "sequência nativa" engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural (p. ex., uma sequência de domínio extracelular ou uma sequência de subunidade transmembranar), formas variantes de ocorrência natural (p. ex., formas de processamento alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural. O termo "ligando de Notch1 de tipo selvagem" refere-se em geral a um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma proteína ligando de Notch1 de ocorrência natural. O termo "sequência de ligando de Notch1 de tipo selvagem" refere-se em geral a uma sequência de aminoácidos verificada num ligando de Notch1 de ocorrência natural.

O termo "NRR de Notch1", tal como aqui utilizado, refere-se, a menos que especificamente ou contextualmente indicado em contrário, a qualquer região polipeptídica nativa ou variante (quer nativa quer sintética) de Notch1 consistindo nos 3 módulos de LNR e nas sequências de aminoácidos carboxi-terminais aos módulos de LNR que se estendem até ao domínio transmembranar, p. ex., os aminoácidos de cerca do número 1446 até cerca de 1735 da sequência de aminoácidos de Notch1 humano (SEQ ID NO:56), e o número de aminoácidos de cerca do número 1446 até cerca de 1725 da sequência de aminoácidos de Notch1 de ratinho (SEQ ID NO:57). O termo "sequência nativa" engloba especificamente

formas truncadas de ocorrência natural, formas variantes de ocorrência natural (p. ex., formas de processamento alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural. O termo "NRR de Notch1 de tipo selvagem" refere-se em geral a um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma NRR de Notch1 de ocorrência natural. A NRR de Notch1 é um polipéptido contendo os aminoácidos 1446 a 1735 de SEQ ID NO:56 ou os aminoácidos 1446 a 1725 de SEQ ID NO:57. Nalguns aspectos, a NRR de Notch1 está contida num Notch1, tal como, por exemplo, um Notch1 processado nos locais S1, S2 e/ou S3, ou num Notch1 não processado. Nalguns aspectos, a NRR de Notch1 contém dois ou mais fragmentos ligados não covalentemente de uma sequência de aminoácidos de NRR de Notch1, p. ex., um fragmento contendo os aminoácidos 1446 a 1664 de SEQ ID NO:56 é ligado não covalentemente a um fragmento contendo os aminoácidos 1665 a 1735 de SEQ ID NO:56. Noutro aspecto, um fragmento contendo os aminoácidos 1446 a 1654 de SEQ ID NO:57 é ligado não covalentemente a um fragmento contendo os aminoácidos 1655 a 1725 de SEQ ID NO:57.

O termo "sinalização de Notch1 aumentada", tal como aqui utilizado refere-se a um aumento na sinalização de Notch1 que é pelo menos duas vezes acima do nível de sinalização de Notch1 observado num controlo sob condições idênticas, por exemplo, utilizando o ensaio de luciferase aqui descrito nos Exemplos 5 e 6. Desejavelmente, o aumento na sinalização de Notch1 é pelo menos três vezes, quatro vezes, cinco vezes, ou mesmo dez vezes acima (ou mais) o nível observado no controlo.

O termo "sinalização de Notch1 diminuída", tal como aqui utilizado refere-se a uma diminuição na sinalização de Notch1 que é pelo menos duas vezes abaixo do nível de sinalização de Notch1 observado num controlo sob condições idênticas, por exemplo, utilizando o ensaio de luciferase aqui descrito nos Exemplos 5 e 6. Desejavelmente, a diminuição na sinalização de Notch1 é pelo menos três vezes, quatro vezes, cinco vezes, ou mesmo dez vezes abaixo (ou mais) o nível observado no controlo.

Os termos "mutação de activação de Notch1" e "mutação que activa a sinalização de Notch1" referem-se a uma inserção de um ou mais aminoácidos, uma deleção de um ou mais aminoácidos, ou uma substituição de um ou mais aminoácidos relativamente a uma sequência de aminoácidos de Notch1 de tipo selvagem que resulta em maior sinalização de Notch1 em comparação com a sinalização de Notch1 da correspondente sequência de aminoácidos de Notch1 de tipo selvagem ou a uma inserção de um ou mais nucleótidos, uma deleção de um ou mais nucleótidos, uma translocação de um ou mais nucleótidos, ou uma substituição de um ou mais nucleótidos relativamente a uma sequência de ácido nucleico de Notch1 de tipo selvagem que resulta em maior sinalização de Notch1 numa célula contendo a sequência de ácido nucleico mutante em comparação com a sinalização de Notch1 numa célula contendo a correspondente sequência de ácido nucleico de Notch1 de tipo selvagem. A sinalização de Notch1 a partir de um receptor Notch1 contendo uma mutação de activação pode ser dependente do ligando ou independente do ligando.

Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são utilizados alternadamente no sentido mais amplo e incluem anticorpos monoclonais (p. ex., anticorpos monoclonais inteiros ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (p. ex, anticorpos biespecíficos desde que exibam a actividade biológica desejada) e podem também incluir certos fragmentos de anticorpo (tal como aqui descrito em maior detalhe). Um anticorpo pode ser humano, humanizado, e/ou de afinidade maturada.

O termo "variável" refere-se ao facto de certas porções dos domínios variáveis diferirem extensivamente na sequência entre anticorpos e serem utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para o seu antígeno particular. No entanto, a variabilidade não está uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis dos anticorpos. Está concentrada em três segmentos chamados regiões determinantes de complementaridade (CDR) ou regiões hipervariáveis nos domínios variáveis tanto da cadeia leve como da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são chamadas a estrutura (FR). Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves nativas

compreendem cada um quatro regiões FR, adoptando largamente uma configuração de folha β , ligadas através de três CDR, que formam voltas ligando, e nalguns casos fazendo parte de, a estrutura de folha β . As CDR em cada cadeia são mantidas juntas em estreita proximidade através das regiões FR e, com as CDR da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antígeno dos anticorpos (ver Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Os presentes domínios não estão envolvidos directamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, tais como participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpos.

A digestão com papaína de anticorpos produz dois fragmentos idênticos de ligação ao antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antígeno, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflecte a sua capacidade para cristalizar facilmente. O tratamento com pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ que possui dois locais de combinação com o antígeno e é ainda capaz de se ligar de forma cruzada ao antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de reconhecimento e ligação ao antígeno completo. Numa espécie Fv de duas cadeias, esta região consiste num dímero de um domínio variável da cadeia pesada e um da leve em firme associação não covalente. Numa espécie de Fv de cadeia simples, um domínio variável da cadeia pesada e um da leve podem ser covalentemente ligados através de um ligador peptídico flexível de modo a que as cadeias leve e pesada se possam associar numa estrutura "dimérica" análoga aquela numa espécie Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDR de cada domínio variável interagem para definir um local de ligação ao antígeno à superfície do dímero VH-VL. Colectivamente, as seis CDR conferem especificidade de ligação ao antígeno ao anticorpo. No entanto, mesmo um domínio variável simples (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDR específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e se ligar ao antígeno, embora com uma menor afinidade que o local de ligação inteiro.

O fragmento Fab contém também o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carboxilo do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região charneira do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' em que o ou os resíduos de cisteína dos domínios constantes possuem um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo F(ab')₂ foram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de charneira entre eles. Outras ligações químicas de fragmentos de anticorpo são também conhecidas.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominados capa (κ) e lambda (λ), com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias destas divididas ainda em subclasses (isotipos), p. ex., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamados α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Os "fragmentos de anticorpo" compreendem apenas uma porção de um anticorpo intacto, em que a porção retém de preferência pelo menos uma, de preferência a maior parte ou a totalidade das funções que estão normalmente associadas a essa porção, quando presente num anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia simples; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo. Num aspecto, um fragmento de anticorpo compreende um local de ligação ao antígeno do anticorpo intacto e mantém assim a capacidade de se ligar ao antígeno. Noutro aspecto, um fragmento de anticorpo, por exemplo um que

compreende a região Fc, mantém pelo menos uma das funções biológicas normalmente associadas à região Fc quando presente num anticorpo intacto, tal como ligação a FcRn, modulação da semivida do anticorpo, função ADCC e ligação ao complemento. Num aspecto, um fragmento de anticorpo é um anticorpo monovalente que tem uma semivida *in vivo* substancialmente similar a um anticorpo intacto. Por exemplo, um tal fragmento de anticorpo pode compreender um braço de ligação ao antigénio ligado a uma sequência de Fc capaz de conferir estabilidade *in vivo* ao fragmento.

O termo "região hipervariável", "HVR", ou "HV", quando aqui utilizado refere-se às regiões de um domínio variável de anticorpo que são hipervariáveis na sequência e/ou formam voltas estruturalmente definidas. Em geral, os anticorpos compreendem seis regiões hipervariáveis; três na VH (H1, H2, H3), e três na VL (L1, L2, L3). Um certo número de delineações da região hipervariável está em uso e são aqui abrangidas. As Regiões Determinantes de Complementaridade (CDR) de Kabat são baseadas na variabilidade da sequência e são as mais vulgarmente utilizadas (Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia refere-se em vez disso à localização das voltas estruturais (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). As regiões hipervariáveis AbM representam um compromisso entre as CDR de Kabat e as voltas estruturais de Chothia, e são utilizadas pelo software de modelação de anticorpos AbM de Oxford Molecular. As regiões hipervariáveis de "contacto" são baseadas numa análise das estruturas cristalinas dos complexos disponíveis. Os resíduos de cada uma destas regiões hipervariáveis são indicados abaixo.

Volta ----	Kabat -----	AbM ---	Chothia -----	Contacto -----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeração de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeração de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

As regiões hipervariáveis podem compreender "regiões hipervariáveis estendidas" como se segue: 24-36 ou 24-34 (L1), 46-56 ou 50-56 (L2) e 89-97 (L3) na VL e 26-35 (H1), 50-65 ou 49-65 (H2) e 93-102, 94-102 ou 95-102 (H3) na VH. Os resíduos do domínio variável são numerados de acordo com Kabat *et al.*, *supra* para cada uma destas definições.

Resíduos de "estrutura" ou "FR" são aqueles resíduos do domínio variável para além dos resíduos da região hipervariável tal como aqui definido.

Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (p. ex., de murídeo) são anticorpos quiméricos que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) no qual resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato, coelho ou primata não humano possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos pelos correspondentes resíduos não humanos. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não se encontram no anticorpo receptor nem no anticorpo dador. Estas modificações são feitas para refinar mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as voltas

hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FR são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá opcionalmente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Ver também os seguintes artigos de revisão e referências neles citadas: Vaswani e Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994).

Os anticorpos (imunoglobulinas) "quiméricos" têm uma porção da cadeia pesada e/ou leve idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma determinada espécie ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto o restante da ou das cadeias é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que exibam a actividade biológica desejada (Patente U.S. No. 4816567; e Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)). O anticorpo humanizado tal como aqui utilizado é um subconjunto de anticorpos quiméricos.

Os fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia simples" ou "scFv" compreendem aos domínios VH e VL do anticorpo, em que estes domínios estão presentes numa única cadeia polipeptídica. Em geral, o polipéptido scFv compreende ainda um ligador polipeptídico entre os domínios VH e VL que permite que scFv forme a estrutura desejada para ligação ao antígeno. Para uma revisão de scFv ver Pluckthun, em "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994).

Um "antígeno" é um antígeno pré-determinado ao qual um anticorpo se pode ligar selectivamente. O antígeno alvo pode ser polipéptido, hidrato de carbono, ácido nucleico, lípido,

hapteno ou outro composto de ocorrência natural ou sintético. De preferência, o antígeno alvo é um polipéptido.

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação ao antígeno, fragmentos que compreendem um domínio variável da cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável da cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH-VL). Utilizando um ligador que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação ao antígeno. Os diacorpos são descritos mais completamente em, por exemplo, EP 404097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Um "anticorpo humano" é um que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde à de um anticorpo produzido por um humano e/ou foi produzido utilizando qualquer uma das técnicas para produção de anticorpos humanos tal como aqui divulgado. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação ao antígeno não humanos.

Um anticorpo "de afinidade maturada" é um com uma ou mais alterações numa ou mais CDR deste que resultam numa melhoria na afinidade do anticorpo para o antígeno, em comparação com um anticorpo original que não possua a ou as alterações. Os anticorpos de afinidade maturada preferidos terão afinidades nanomolares ou mesmo picomolares para o antígeno alvo. Os anticorpos de afinidade maturada são produzidos através de procedimentos conhecidos na técnica. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) descreve a maturação de afinidade através de baralhação dos domínios VH e VL. A mutagénese aleatória dos resíduos de CDR e/ou estrutura é descrita por: Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

As "funções efectoras" do anticorpo referem-se aquelas actividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc de sequência de aminoácidos variante) de um anticorpo e variam com o isotipo do anticorpo. Exemplos de funções efectoras de anticorpo incluem: ligação a C1q e citotoxicidade dependente do complemento; ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; subregulação de receptores da superfície celular (p. ex., receptor de células B); e activação de células B.

"Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos" ou "ADCC" refere-se a uma forma de citotoxicidade em que Ig segregadas ligadas em receptores de Fc (FcR) presentes em certas células citotóxicas (p. ex., células Assassinas Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) permitem que estas células efectoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo possuindo o antigénio e subsequentemente matem a célula alvo com citotoxinas. Os anticorpos "armam" as células citotóxicas e são absolutamente necessários para tal morte. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, enquanto os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para avaliar a actividade de ADCC de uma molécula de interesse, pode ser realizado um ensaio *in vitro* de ADCC, tal como o descrito na Patente US No. 5500362 ou 5821337 ou Patente US No. 6737056 de Presta. Células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células Assassinas Naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a actividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, p. ex., num modelo animal tal como o descrito em Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

"Células efectoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcR e executam funções efectoras. De preferência, as células expressam pelo menos FcγRIII e executam uma função efectora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células assassinas naturais (NK), monócitos, células

T citotóxicas e neutrófilos; sendo preferidas as PBMC e células NK. As células efectoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa, p. ex., a partir do sangue.

"Receptor de Fc" ou "FcR" descreve um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR de sequência de humana nativa. Além disso, um FcR preferido é um que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII, e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e formas de processamento alternativo destes receptores. Os receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de activação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), que têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem primariamente nos domínios citoplasmáticos destes. O receptor de activação FcγRIIA contém um motivo de activação imuno-receptor baseado em tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição FcγRIIB contém um motivo de inibição imuno-receptor baseado em tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático. (ver revisão M. em Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Os FcR são revistos em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); e de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Outros FcR, incluindo aqueles a identificar no futuro, estão englobados pelo termo "FcR" aqui. O termo inclui também o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgG maternas para o feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)) e regula a homeostasia das imunoglobulinas. WO 00/42072 (Presta) descreve variantes de anticorpo com ligação melhorada ou diminuída a FcR. O conteúdo desta publicação de patente é aqui especificamente incorporado por referência. Ver, também, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591-6604 (2001).

Os métodos de medição da ligação a FcRn são conhecidos (ver, p. ex., Ghetie 1997, Hinton 2004). A ligação a FcRn humano *in vivo* e a semivida no soro de polipéptidos de ligação de alta afinidade a FcRn humano podem ser ensaiadas, p. ex. em ratinhos transgénicos ou linhas celulares humanas transfectadas expressando FcRn humano, ou em primatas administrados com os polipéptidos variantes de Fc.

A "citotoxicidade dependente do complemento" ou "CDC" refere-se à lise de uma célula alvo na presença do complemento. A activação da via clássica do complemento é iniciada através da ligação do primeiro componente do sistema do complemento (C1q) a anticorpos (da subclasse adequada) que se ligam ao seu antígeno cognato. Para avaliar a activação do complemento, pode ser realizado um ensaio de CDC, p. ex., tal como descrito em Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*. 202: 163 (1996).

Variantes de polipéptidos com sequências de aminoácidos da região Fc alteradas e maior ou menor capacidade de ligação a C1q estão descritas na patente US No. 6194551B1 e WO 99/51642. O conteúdo destas publicações de patente é aqui especificamente incorporado por referência. Veja-se, também, Idusogie et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

O termo "polipéptido compreendendo a região Fc" refere-se a um polipéptido, tal como um anticorpo ou uma imunoadesina, que compreende uma região Fc. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração de EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a purificação do polipéptido ou através de engenharia recombinante do ácido nucleico codificando o polipéptido. Por conseguinte, uma composição compreendendo um polipéptido possuindo uma região Fc de acordo com este invento pode compreender polipéptidos com K447, com todos os K447 removidos, ou uma mistura de polipéptidos com ou sem o resíduo K447.

Um anticorpo de "bloqueio" ou um anticorpo "antagonista" é um que inibe ou reduz a actividade biológica do antígeno ao qual se liga. Os anticorpos de bloqueio preferidos ou anticorpos antagonistas inibem substancialmente ou completamente a actividade biológica do antígeno. Desejavelmente, a actividade biológica é reduzida em 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou mesmo 100%.

Um "anticorpo agonista", tal como aqui utilizado, é um anticorpo que imita pelo menos uma das actividade funcionais de um polipéptido de interesse.

Uma "estrutura aceitadora humana" para os fins aqui é uma estrutura compreendendo a sequência de aminoácidos de uma estrutura de VL ou VH derivada de uma estrutura de imunoglobulina humana, ou de uma estrutura de consenso humana. Uma estrutura aceitadora humana "derivada de" uma estrutura de imunoglobulina humana ou estrutura de consenso humana pode compreender a mesma sequência de aminoácidos desta, ou pode conter alterações pré-existentes na sequência de aminoácidos. Quando estão presentes alterações de aminoácidos pré-existentes, de preferência estão presentes não mais do que 5 e de preferência 4 ou menos, ou 3 ou menos, alterações de aminoácidos pré-existentes. Quando alterações de aminoácidos pré-existentes estão presentes numa VH, de preferência as alterações estão apenas em três, dois, ou uma das posições 71H, 73H e 78H; por exemplo, os resíduos de aminoácidos naquelas posições pode ser 71A, 73T, e/ou 78A. Numa concretização, a estrutura do aceitador humano de VL é idêntica na sequência à sequência de estrutura da imunoglobulina humana de VL ou sequência de estrutura de consenso humana.

Uma "estrutura de consenso humana" é uma estrutura que representa o resíduo de aminoácido que ocorre mais frequentemente numa selecção de sequências de estrutura de VL ou VH de imunoglobulina humana. Geralmente, a selecção de sequências de VL ou VH de imunoglobulina humana é a partir de um subgrupo de sequências de domínio variável. Em geral, o subgrupo de sequências é um subgrupo tal como em Kabat *et al.* Numa concretização, para o VL, o subgrupo é o subgrupo capa I tal como em Kabat *et al.* Numa concretização, para o VH, o subgrupo é o subgrupo III, tal como em Kabat *et al.*

Uma "estrutura de consenso de VH subgrupo III" compreende a sequência de consenso obtida a partir das sequências de aminoácidos na pesada variável subgrupo III de Kabat *et al.* Numa concretização, a sequência de aminoácidos da estrutura de consenso de VH subgrupo III compreende pelo menos uma porção ou a totalidade de cada uma das seguintes sequências: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:44)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

Uma "estrutura de consenso de VL subgrupo I" compreende a sequência de consenso obtida a partir das sequências de aminoácidos na leve variável capa subgrupo I de Kabat *et al.* Numa concretização, a sequência de aminoácidos da estrutura de consenso de VH subgrupo I compreende pelo menos uma porção ou a totalidade de cada uma das seguintes sequências: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:18).

Um "distúrbio" ou uma "doença" é qualquer condição que possa beneficiar de tratamento com uma substância/molécula ou um método do invento. Isto inclui distúrbios ou doenças crónicos e agudos, incluindo as condições patológicas que predispõem o mamífero ao distúrbio em questão. Exemplos não limitantes de distúrbios a serem aqui tratados incluem tumores benignos e malignos, carcinoma, blastoma e sarcoma.

Os termos "distúrbio proliferativo celular" e "distúrbio proliferativo" referem-se a distúrbios que estão associados a um certo grau de proliferação celular anormal. Numa concretização, o distúrbio proliferativo celular é cancro.

"Tumor", tal como aqui utilizado, refere-se a todo o crescimento e proliferação de células neoplásicas, malignas ou benignas, e todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos. Os termos "cancro", "canceroso", "distúrbio proliferativo celular", "distúrbio proliferativo", e "tumor" não são mutuamente exclusivos tal como aqui referido.

Os termos "cancro" e "canceroso" refere-se ou descreve a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento/proliferação celular desregulado. Exemplos de cancro incluem mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cancros incluem cancro de células escamosas, cancro do pulmão de células pequenas, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão, carcinoma epidermóide do pulmão, cancro do peritoneu, cancro hepatocelular, cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro do

colo do útero, cancro do ovário, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro colorrectal, carcinoma do endométrio ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, cancro do rim, cancro do fígado, cancro da próstata, cancro da vulva, cancro da tiróide, carcinoma hepático, cancro gástrico, melanoma, e vários tipos de cancro da cabeça e do pescoço. A desregulação da angiogénese pode levar a muitos distúrbios que podem ser tratados através de composições e métodos do invento. Estes distúrbios incluem ambas condições não neoplásicas e neoplásicas. As neoplásicas incluem, mas não estão limitadas a, as descritas acima. Os distúrbios não neoplásicos incluem, mas não estão limitados a, hipertrofia indesejada ou aberrante, artrite, artrite reumatóide (AR), psoríase, placas de psoríase, sarcoidose, aterosclerose, placas de aterosclerose, retinopatias diabéticas e outras proliferativas incluindo retinopatia da prematuridade, fibroplasia retrolenticular, glaucoma neovascular, degeneração macular relacionada com a idade, edema macular diabético, neovascularização da córnea, neovascularização de enxerto da córnea, rejeição de enxerto da córnea, neovascularização da retina/coróide, neovascularização do ângulo (rubeose), doença neovascular ocular, restenose vascular, malformações arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias da tiróide (incluindo doença de Grave), transplante de tecido da córnea e outros, inflamação crónica, inflamação pulmonar, lesão pulmonar aguda/SDRA, sepsia, hipertensão pulmonar primária, efusões pulmonares malignas, edema cerebral (p. ex., associado a AVC agudo/lesão cerebral encerrada/traumatismo), inflamação sinovial, formação de panos na AR, miosite ossificante, formação óssea hipertrófica, osteoartrite (OA), ascites refractárias, doença do ovário poliquístico, endometriose, 3º espaçamento das doenças de fluidos (pancreatite, síndrome de compartimento, queimaduras, doença intestinal), miomas uterinos, parto prematuro, inflamação crónica tal como IBD (doença de Crohn e colite ulcerosa), rejeição de aloenxerto renal, doença inflamatória do intestino, síndrome nefrótica, crescimento de massa de tecido indesejado ou aberrante (sem ser cancro), articulações hemofílicas, cicatrizes hipertróficas, inibição do crescimento do cabelo, síndrome de Osler-Weber, fibroplasias retrolenticulares de granuloma

piogénico, esclerodermia, tracoma, adesões vasculares, sinovite, dermatite, pré-eclâmpsia, ascite, efusão do pericárdio (tal como a associada a pericardite), e efusão pleural.

Os termos "doença neurodegenerativa" e "distúrbio neurodegenerativo" são utilizados no sentido mais amplo para incluir todos os distúrbios cuja patologia envolva degeneração e/ou disfunção neuronal, incluindo, sem limitação, neuropatias periféricas; distúrbios neuromotores, tais como esclerose lateral amiotrófica (ALS, doença de Lou Gehrig), paralisia de Bell, e várias condições envolvendo atrofia ou paralisia muscular espinal; e outras doenças neurodegenerativas humanas, tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, esclerose múltipla, coreia de Huntington, Síndrome de Down, surdez nervosa e doença de Meniere.

A "neuropatia periférica" é um distúrbio neurodegenerativo que afecta os nervos periféricos, mais frequentemente manifestado como uma, ou uma combinação de disfunção motora, sensorial, sensorimotora ou autonómica. As neuropatias periféricas podem, por exemplo, ser geneticamente adquiridas, podem resultar de uma doença sistémica, ou podem ser induzidas por um agente tóxico, tal como uma droga neurotóxica, p. ex., agente antineoplásico, ou poluente industrial ou ambiental.

A "neuropatia sensorial periférica" é caracterizada pela degeneração dos neurónios sensoriais periféricos, e pode ser idiopática, pode ocorrer, por exemplo, como consequência de diabetes (neuropatia diabética), terapia de fármaco citostático em cancro (p. ex., tratamento com agentes quimioterapêuticos tais como vincristina, cisplatina, metotrexato, 3'-azido-3'-desoxitimidina, ou taxanos, p. ex. paclitaxel [TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.] e doxetaxel [TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, França]), alcoolismo, síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), ou predisposição genética. As neuropatias periféricas geneticamente adquiridas incluem, por exemplo, doença de Refsum, doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática, doença de Fabry, síndrome de Dejerine-Sottas,

Abetalipoproteinemia, e Doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (também conhecida como Atrofia Muscular Proneal ou Neuropatia Sensorimotora Hereditária (HMSN)). A maioria dos tipos de neuropatia periférica desenvolve-se lentamente, ao longo de vários meses ou anos. Na prática clínica tais neuropatias são chamadas crónicas. Por vezes, uma neuropatia periférica desenvolve-se rapidamente, ao longo de alguns dias, e é referida como aguda. A neuropatia periférica afecta geralmente os nervos sensoriais e motores em conjunto de modo a provocar uma neuropatia sensorial e motora mista, mas são também conhecidas neuropatias sensoriais puras e motoras puras.

Uma "doença auto-imune" tal como aqui utilizado refere-se a qualquer distúrbio cuja patologia envolva uma resposta imunitária contra um tecido do próprio indivíduo. Doenças auto-imunes incluem, mas não estão limitadas a, artrite reumatóide (AR), asma, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), doença inflamatória do intestino, doença celíaca, rinite alérgica, urticária alérgica, doença de Crohn, doença de Hirschsprung, doença de Grave, doença de Addison, síndrome de Guillain-Barré, doença de Hashimoto, doenças inflamatórias intra-oculares alérgicas, espondilite anquilosante, dermatite atópica, anemia hemolítica auto-imune, hepatite auto-imune, doença de Behcet, síndrome de Cogan, dermatite de contacto, síndrome de Cushing, dermatomiosite, diabetes mellitus, lúpus eritematoso discóide, nefrite de lúpus, fascíte eosinofílica, eritema nodoso, dermatite esfoliativa, glomeruloesclerose focal ou segmentar, arterite de células gigantes, gota, artrite gotosa, eczema da mão, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, hirsutismo, cerato-esclerite idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, dermatoses inflamatórias, esclerose múltipla, miastenia grave, miosite, osteoartrite, pancreatite, penfigóide gestacional, pênfigo vulgar, periodontite, poliartrite nodosa, polimialgia reumática, prurido do escroto, prurite/inflamação, psoríase, artrite psoriática, histoplasmose pulmonar, policondrite recidiva, rosácea, sarcoidose, esclerodermia, síndrome de choque séptico, tendinite ou bursite do ombro, síndrome de Sjogren, doença de Still, doença de Sweet, lúpus eritematoso sistémico, esclerose sistémica, arterite de Takayasu, arterite temporal,

necrólise epidérmica tóxica, rejeição de transplantes, tuberculose, diabetes de tipo 1, colite ulcerosa, uveíte, vasculite, e granulomatose de Wegener.

Um "distúrbio imunológico" tal como é aqui utilizado refere-se a qualquer distúrbio cuja patologia envolva o desenvolvimento ou a regulação anormal do sistema imunitário num indivíduo. Desejavelmente, o distúrbio imunológico envolve o desenvolvimento ou a regulação anormal de células T.

Um "medicamento" é um fármaco activo para tratar o distúrbio em causa ou os seus sintomas, ou efeitos colaterais.

Tal como aqui utilizado, "tratamento" refere-se a uma intervenção clínica numa tentativa de alterar o curso natural do indivíduo ou da célula a tratar, e pode ser realizado quer para profilaxia ou durante o curso de patologia clínica. Efeitos desejáveis do tratamento incluem prevenção da ocorrência ou recorrência da doença, alívio dos sintomas, diminuição de quaisquer consequências patológicas directas ou indirectas da doença, prevenção de metástase, diminuição da velocidade de progressão da doença, melhoria ou palição do estado de doença, e remissão ou prognóstico melhorado. Em algumas concretizações, os anticorpos do invento são utilizados para atrasar o desenvolvimento de uma doença ou um distúrbio.

Um "indivíduo" é um vertebrado, de preferência um mamífero, de maior preferência um humano. Os mamíferos incluem, mas não se limitam a, animais de quinta (tais como vacas), animais de desporto, animais de estimação (tais como gatos, cães e cavalos), primatas, ratinhos e ratos.

"Mamífero" para fins de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de quinta, e animais de zoológico, de desporto, ou de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. De preferência, o mamífero é humano.

Uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico ou profilático desejado.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de uma substância/molécula do invento, agonista ou antagonista pode variar de acordo com factores tais como o estado da doença, a idade, o sexo e o peso do indivíduo, e a capacidade da substância/molécula, agonista ou antagonista para desencadear uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da substância/molécula, agonista ou antagonista são superados pelos efeitos benéficos terapêuticos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e durante os períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, mas não necessariamente, uma vez que uma dose profilática é utilizada em indivíduos antes de, ou numa fase mais precoce da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será inferior à quantidade terapeuticamente eficaz.

O termo "agente citotóxico" tal como aqui utilizado refere-se a uma substância que inibe ou previne a função das células e/ou causa destruição das células. O termo pretende incluir isótopos radioactivos (p. ex., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapêuticos p. ex., metrotrexato, adriamicina, alcalóides vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina ou outros agentes intercalantes, enzimas e fragmentos destes tais como enzimas nucleolíticas, antibióticos, e toxinas tais como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimaticamente activas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes destes, e os vários agentes anti-tumorais ou anticancro divulgados abaixo. Outros agentes citotóxicos são descritos abaixo. Um agente tumoricida provoca a destruição de células tumorais.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de cancro. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetra-hidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas, ácido betulínico, uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano (HYCANTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, scoplectina, e 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo os seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de azoto tais como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracilo; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos enediina (p. ex., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamaII e caliqueamicina omegaII (ver, p. ex., Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como cromóforo neocarzinostatina e cromóforos antibióticos enediina cromoproteínas relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina

C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tais como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; androgénios tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-supra-renais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositores de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; um epotilona; etoglúcido; nitrato de gálio; hidroxureia; lentinano; lonidainina; maitansinóides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona, mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona, 2-etil-hidrazida; procarbazona; complexo polissacarídico ASK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE[®], FILDESIN[®]); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxóides, p. ex., paclitaxel TAXOL[®] (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulação de nanopartículas de paclitaxel modificadas com albumina sem Cremophor ABAXANETM (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), e doxetaxel TAXOTERE[®] (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França); cloranbucil; gemcitabina (GEMZAR[®]); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina (VELBAN[®]); platina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN[®]); oxaliplatina; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE[®]); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor da topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO);

retinóides tais como ácido retinóico, capecitabina (XELODA®); sais, ácidos ou derivados de qualquer um dos acima farmacologicamente aceitáveis; bem como combinações de dois ou mais dos acima tais como CHOP, uma abreviatura para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviatura para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATIN™) combinada com 5-FU e leucovorina.

Também incluídos nesta definição estão agentes anti-hormonais que actuam para regular, reduzir, bloquear ou inibir os efeitos das hormonas que podem promover o crescimento de cancro, e estão frequentemente na forma de tratamento sistémico, ou de todo o corpo. Estes podem ser as próprias hormonas. Exemplos incluem anti-estrogénios e moduladores selectivos de receptores de estrogénios (SERM), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona, e toremifeno FARESTON®; anti-progesteronas; subreguladores de receptores de estrogénios (ERD); agentes que funcionam suprimindo ou desligando os ovários, por exemplo, agonistas da hormona de libertação da hormona luteinizante (LHRH) tais como LUPRON® e acetato de leuprolide ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina, e tripterelina; outros anti-androgénios tais como flutamida, nilutamida e bicalutamida; e inibidores da aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrogénio nas glândulas supra-renais, tais com, por exemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol REVISOR®, letrozol FEMARA®, e anastrozol ARAMIDEX®. Além disso, tal definição de agentes quimioterapêuticos inclui bisfosfonatos tais como clodronato (por exemplo, BONEFOS® ou OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID®, ou risedronato ACTONEL®; bem como troxacitabina (um análogo 1,3-dioxolano do nucleósido citosina); oligonucleótidos anti-sentido, particularmente os que inibem a expressão de genes em vias de sinalização envolvidas em proliferação celular aberrante, tal como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras e receptor do factor

de crescimento epidérmico (EGF-R); vacinas tais como vacina THERATOPE® e vacinas de terapia génica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN®, e vacina VAXID®; inibidor da topoisomerase I LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato lapatinib (um inibidor de molécula pequena da tirosina-cinase dupla de ErbB-2 e EGFR também conhecido como GW572016); e sais, ácidos ou derivados de qualquer um dos acima farmaceuticamente aceitáveis.

Um "agente inibidor do crescimento" quando aqui utilizado refere-se a um composto ou uma composição que inibe o crescimento de uma célula (tal como uma célula expressando Notch1) quer *in vitro* quer *in vivo*. Assim, o agente inibidor do crescimento pode ser um que reduza significativamente a percentagem de células (tal como uma célula expressando Notch1) em fase S. Exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (num local diferente da fase S), tais como agentes que induzem paragem em G1 e paragem na fase M. Bloqueadores clássicos da fase M incluem os vincas (vincristina e vinblastina), taxanos e inibidores da topoisomerase II tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, e bleomicina. Os agentes que param G1 também extravasam para paragem na fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo, e ara-C. Mais informação pode ser verificada em "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente pág. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) são fármacos anticancro ambos derivados do teixo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado do teixo europeu, é um análogo semi-sintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel e docetaxel promovem a montagem de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina e estabilizam os microtúbulos através de prevenção da despolimerização, que resulta na inibição da mitose em células.

A "doxorubicina" é um antibiótico antraciclina. O nome químico completo da doxorubicina é (8S-cis)-10-[(3-amino-

2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxil]-7,8,9,10-tetra-hidro-6,8,11-tri-hidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

O termo "composição antineoplásica" refere-se a uma composição útil em tratamento de cancro compreendendo pelo menos um agente terapêutico activo, p. ex., "agente anticancro". Exemplos de agentes terapêuticos (agentes anticancro, também aqui denominados "agentes antineoplásicos") incluem, mas estão limitados a, p. ex., agentes quimioterapêuticos, agentes inibidores do crescimento, agentes citotóxicos, agentes utilizados em terapia de radiação, agentes anti-angiogénese, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, toxinas, e outros agentes para tratar cancro, p. ex., anticorpos neutralizantes anti-VEGF, antagonista de VEGF, anti-HER-2, anti-CD20, um antagonista do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) (p. ex., um inibidor da tirosina-cinase), inibidor de HER1/EGFR, erlotinib, um inibidor de COX-2 (p. ex., celecoxib), interferões, citocinas, antagonistas (p. ex., anticorpos neutralizantes) que se ligam a um ou mais dos receptores de ErbB2, ErbB3, ErbB4, ou VEGF, inibidores para os receptores tirosina-cinase para o factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e/ou factor de células estaminais (SCF) (p. ex., mesilato de imatinib (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2, e outros agentes bioactivos e químicos orgânicos, etc.

O termo "pró-fármaco" tal como utilizado neste pedido refere-se a uma forma precursora ou derivada de uma substância farmacologicamente activa que é menos citotóxica para células tumorais em comparação com o fármaco original e é capaz de ser enzimaticamente activado ou convertido na forma original mais activa. Ver, p. ex., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, págs. 375-382, 615ª Meeting Belfast (1986) e Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Os pró-fármacos deste invento incluem, mas não estão limitados a, pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo péptidos, pró-

fármacos modificados com D-aminoácidos, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos contendo beta-lactâmicos, pró-fármacos contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituída ou pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, pró-fármacos de 5-fluorocitosina e outros de 5-fluorouridina que podem ser convertidos no fármaco livre citotóxico mais activo. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivados numa forma de pró-fármaco para utilização neste invento incluem, mas não estão limitados a, os agentes quimioterapêuticos descritos acima.

Um "agente anti-angiogénese" ou "inibidor de angiogénese" refere-se a uma substância de pequeno peso molecular, um polinucleótido, um polipéptido, uma proteína isolada, uma proteína recombinante, um anticorpo, ou conjugados ou proteínas de fusão destes, que inibe angiogénese, vasculogénese, ou permeabilidade vascular indesejável, seja directa ou indirectamente. Por exemplo, um agente anti-angiogénese é um anticorpo ou outro antagonista para um agente angiogénico tal como definido acima, p. ex., anticorpos para VEGF, anticorpos para receptores de VEGF, moléculas pequenas que bloqueiam a sinalização do receptor de VEGF (p. ex., PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706). Os agentes anti-angiogénese incluem também inibidores de angiogénese nativos, p. ex., angiostatina, endostatina, etc. Ver, p. ex., Klagsbrun e D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit e Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003) (p. ex., a Tabela 3 lista terapia anti-angiogénica em melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (p. ex., a Tabela 2 lista factores anti-angiogénicos); e, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003) (p. ex., a Tabela 1 lista agentes anti-angiogénicos utilizados em ensaios clínicos).

Uma "amostra biológica" (indiferentemente denominada "amostra" ou "amostra de tecido ou celular") engloba uma variedade de tipos de amostras obtidas de um indivíduo e pode ser usada num ensaio de diagnóstico ou monitorização. A definição engloba amostras de sangue e de outros líquidos de origem biológica, amostras de tecidos sólidos, tais como um espécimen de biopsia ou culturas de tecidos ou células

derivadas destes, e a descendência destas. A definição inclui também amostras que foram manipuladas de alguma forma após a sua recolha, tal como através de tratamento com reagentes, solubilização, ou enriquecimento em determinados componentes, tais como proteínas ou polinucleótidos, ou impregnação numa matriz semi-sólida ou sólida para fins de seccionamento. O termo "amostra biológica" engloba uma amostra clínica, e inclui também células em cultura, sobrenadantes celulares, lisados celulares, soro, plasma, fluido biológico e amostras de tecidos. A fonte da amostra biológica pode ser tecido sólido, tal como a partir de órgãos frescos, congelados e/ou conservados ou amostra de tecido ou biopsia ou aspirado; sangue ou quaisquer constituintes do sangue; fluidos corporais tais como fluido cerebral espinal, líquido amniótico, fluido peritoneal, ou fluido intersticial; células de qualquer período de gestação ou desenvolvimento do indivíduo. Nalguns aspectos, a amostra biológica é obtida a partir de um tumor primário ou metastático. A amostra biológica pode conter compostos que não são naturalmente intermisturados com o tecido na natureza tais como conservantes, anticoagulantes, tampões, fixadores, nutrientes, antibióticos, ou semelhantes.

Para os fins aqui uma "secção" de uma amostra de tecido significa uma parte ou peça única de uma amostra de tecido, p. ex., uma fatia fina de tecido ou células cortadas a partir de uma amostra de tecido. Entende-se que múltiplas secções de amostras de tecidos podem ser colhidas e sujeitas a análise de acordo com o presente invento. Em algumas concretizações, a mesma secção de amostra de tecido é analisada tanto ao nível morfológico como molecular, ou é analisada em relação tanto à proteína como ao ácido nucleico.

A palavra "marcador" quando aqui utilizada refere-se a um composto ou uma composição que é conjugado ou fundido directa ou indirectamente com um reagente, tal como uma sonda de ácido nucleico ou um anticorpo e facilita a detecção do reagente ao qual é conjugado ou fundido. O próprio marcador pode ser detectável (p. ex., marcadores radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou uma composição substrato que é detectável.

Receptor Notch1 e mutações activadoras

Os receptores Notch são proteoliticamente processados durante o transporte para a superfície celular por uma protease semelhante a furina num local S1 cerca de 70 aminoácidos externos ao domínio transmembranar, produzindo uma subunidade Notch extracelular (ECN) e uma subunidade Notch transmembranar (NTM). Estas duas subunidades permanecem associadas de forma não covalente e constituem o receptor da superfície celular heterodimérico maduro. A subunidade ECN de Notch1 contém 36 repetições semelhantes a EGF N-terminais seguidas de três módulos de LNR repetidos em tandem (LNR_A, LNR_B, e LNR_C). Cada módulo de LNR contém três ligações dissulfureto e um grupo de resíduos ácidos e polares conservado, previsto coordenar um ião cálcio. Dentro da região da repetição EGF residem locais de ligação para os ligandos de activação. Os módulos de LNR participam na manutenção de Notch numa conformação de repouso antes da activação induzida pelo ligando. A NTM de Notch1 compreende uma região extracelular, um segmento transmembranar, e uma grande parte intracelular que inclui um domínio RAM (molécula associada a RBP J κ), repetições de anquirina, um domínio de transactivação e uma sequência PEST carboxi-terminal. A associação estável das subunidades ECN e NTM é dependente de um domínio de heterodimerização (HD) incluindo a extremidade carboxi-terminal do ECN (denominada HD-C) e a extremidade extracelular amino-terminal de NTM (denominada HD-N). A ligação de um ligando de Notch à subunidade ECN inicia duas clivagens proteolíticas sucessivas que ocorrem através de proteólise intramembranar regulada. A primeira clivagem através de uma metaloprotease no local de clivagem S2 (localizado no NTM) torna a subunidade transmembranar de Notch susceptível à segunda clivagem no local de clivagem S3 perto do folheto interno da membrana plasmática. A clivagem do local S3, que é catalisada por um complexo multiproteico contendo presenilina e nicastrina, liberta a porção intracelular da subunidade transmembranar de Notch (também designada Notch intracelular; "ICN"), permitindo-lhe translocar-se para o núcleo e activar a transcrição de genes alvo.

As Figuras 11-1 a 11-4 mostram um alinhamento entre as sequências de aminoácidos de Notch1 humana (SEQ ID NO:56) e de ratinho (SEQ ID NO:57). O péptido sinal abrange aproximadamente os aminoácidos 1-18 de SEQ ID NO:56 ou 57, as repetições EGF (EGF1 a EGF36) abrangem aproximadamente os aminoácidos 20-1426 de SEQ ID NO:56 ou 57, LNR_A abrange aproximadamente os aminoácidos 1446-1489 de SEQ ID NO:56 ou 57, LNR_B abrange aproximadamente os aminoácidos 1490-1527 de SEQ ID NO:56 ou 57, LNR_C abrange aproximadamente os aminoácidos 1528-1562 de SEQ ID NO:56 ou 57, HD-N abrange aproximadamente os aminoácidos 1563-1664 de SEQ ID NO:56 ou os aminoácidos 1563-1654 de SEQ ID NO:57, HD-C abrange aproximadamente os aminoácidos 1665-1733 de SEQ ID NO:56 ou os aminoácidos 1655-1723 de SEQ ID NO:57, e o domínio PEST abrange aproximadamente os aminoácidos 2484-2555 de SEQ ID NO:56 ou aproximadamente os aminoácidos 2459-2530 de SEQ ID NO:57. O domínio HD, que inclui HD-N e HD-C, abrange aproximadamente os aminoácidos 1563-1733 de SEQ ID NO:56 ou os aminoácidos 1563-1723 de SEQ ID NO:57. O local de clivagem S1 está entre os aminoácidos 1664 e 1665 de SEQ ID NO:56 e entre os aminoácidos 1654 e 1655 de SEQ ID NO:57. O local de clivagem S2 está entre os aminoácidos 1720 e 1721 de SEQ ID NO:56 e os aminoácidos 1710 e 1711 de SEQ ID NO:57. A porção transmembranar abrange aproximadamente os aminoácidos 1736-1747 de SEQ ID NO:56 e aproximadamente os aminoácidos 1726-1737 de SEQ ID NO:57.

Vários tipos de mutações de Notch1 que afectam a sinalização de Notch1 foram identificadas e caracterizadas. As mutações de Notch1 que activam a sinalização de Notch1 recaem em duas classes gerais - designadamente mutações de activação independentes do ligando e dependentes do ligando. Além disso, algumas mutações de activação independentes do ligando são contudo ainda responsivas ao ligando. As mutações que activam a sinalização de Notch1 foram associadas a T-ALL (Weng *et al.*, *Science* 306: 269-271, 2004; Malecki *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 26: 4642-4651, 2006). Em particular, mutações de activação de Notch1 associadas a T-ALL foram identificadas na região HD e no domínio PEST. Além disso, translocações podem resultar em sinalização de Notch1 aberrante. Por exemplo, descobriu-se que *Notch1* era um gene parceiro numa translocação cromossómica (7;9)(q34;q34.3).

Esta translocação é verificada num subconjunto raro de T-ALL e funde-se com a extremidade 3' do gene *Notch1* para o promotor/estimulador do receptor β de células T (Weng et al., *Science* 306: 269-271, 2004).

Exemplos de mutações independentes do ligando que sinalizam na ausência de ligação do ligando mas que mantêm a capacidade para responder à ligação do ligando são mutações na região HD de *Notch1*. As mutações de activação na região HD-N de *Notch1* humano incluem, por exemplo, L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, L1601P, e I1617T/N. Exemplos de mutações de activação na região HD-C de *Notch1* humano incluem V1677D, L1679P, I1681N, A1702P, I1719T, e uma inserção (ARLGSLNIPYKIEA; SEQ ID NO:52) no local de clivagem de S2 (a inserção P12). As mutações L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, L1601P, I1617T/N, V1677D, L1679P, I1681N, A1702P, e I1719T e a inserção P12 causam aumento da clivagem de S2 e S3 e a sinalização de *Notch1* é superior à sinalização do receptor *Notch1* de tipo selvagem.

Um subconjunto de mutações de activação de *Notch1* reduz a estabilidade do heterodímero - elas enfraquecem a interacção da região ECN com a NTM. Exemplos de mutações que reduzem a estabilidade do heterodímero, em *Notch1* humano incluem L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, I1617T, I1617N, I1681N, A1702P, e I1719T. A inserção P12 deriva de uma duplicação directa que se prevê reposicionar o domínio HD-C endógeno fora do local de clivagem S2, e pode aumentar o acesso do local S2 a metaloproteases (Malecki et al., *Mol. Cell. Biol.* 26: 4642-4651, 2006).

Exemplos de mutações de activação de *Notch1* que são dependentes do ligando incluem mutações no domínio PEST, tais como inserções ou deleções que induzem uma mudança no enquadramento de leitura ou mutações pontuais que criam codões de terminação prematura. A remoção do domínio PEST inibidor é pensada para aumentar a semivida da ICN. Uma mutação exemplar no domínio PEST é DelPEST que é uma deleção carboxi-terminal que começa no aminoácido 2473 da sequência de aminoácidos de *Notch1* humano (SEQ ID NO:57). Outras mutações no domínio PEST são conhecidas na técnica e estão

descritas, por exemplo, em Weng *et al.* (*Science* 306: 269-271, 2004).

Composições do invento e métodos de produzir as mesmas

Esta invenção engloba composições tal como definidas nas reivindicações incluindo composições farmacêuticas, compreendendo um anticorpo anti-NRR de Notch1; e polinucleótidos compreendendo sequências codificando um anticorpo anti-NRR de Notch1. Tal como aqui utilizado, as composições compreendem um ou mais anticorpos que se ligam a NRR de Notch1, e/ou um ou mais polinucleótidos compreendendo sequências codificando um ou mais anticorpos que se ligam a NRR de Notch1. Estas composições podem ainda compreender transportadores adequados, tais como excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluindo tampões, que são bem conhecidos na técnica.

O invento engloba também concretizações de anticorpos e polinucleótidos isolados. O invento engloba também concretizações de anticorpos e polinucleótidos substancialmente puros.

Os anticorpos anti-NRR de Notch1 são de preferência monoclonais. Também englobados dentro do âmbito do invento estão fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH e F(ab')₂ dos anticorpos anti-NRR de Notch1 aqui proporcionados. Estes fragmentos de anticorpo podem ser criados através de meios tradicionais, tais como digestão enzimática, ou podem ser gerados através de técnicas recombinantes. Tais fragmentos de anticorpo podem ser quiméricos ou humanizados. Estes fragmentos são úteis para os fins de diagnóstico e terapêuticos expostos abaixo.

Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, i.e., os anticorpos individuais constituindo a população são idênticos excepto quanto a possível ocorrência natural de mutações que possam estar presentes em quantidades menores. Assim, o adjectivo "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos.

Os anticorpos monoclonais anti-NRR de Notch1 do invento podem ser produzidos utilizando o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser produzidos através de métodos de ADN recombinante (Patente U.S. No. 4816567).

No método de hibridoma, um ratinho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster, é imunizado para desencadear linfócitos que produzam ou sejam capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína utilizada para imunização. Os anticorpos para NRR de Notch1 são em geral criados em animais através de múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) de NRR de Notch1 e um adjuvante. A NRR de Notch1 pode ser preparada utilizando métodos bem conhecidos na técnica, alguns dos quais são ainda aqui descritos. Por exemplo, a produção recombinante de NRR de Notch1 humano e de ratinho é descrita abaixo. Numa concretização, os animais são imunizados com uma NRR de Notch1 fundida com a porção Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. De preferência, os animais são imunizados com uma proteína de fusão NRR de Notch1-IgG1. Os animais são vulgarmente imunizados contra conjugados ou derivados imunogénicos de NRR de Notch1 com monofosforil-lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trealose (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) e a solução é injectada intradermicamente em múltiplos locais. Duas semanas mais tarde os animais são reforçados. 7 a 14 dias mais tarde os animais são sangrados e o soro é ensaiado quanto ao título de anti-NRR de Notch1. Os animais são reforçados até o título atingir um patamar.

Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*", pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e cultivadas num meio de cultura adequado que contém de preferência uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma não fundidas

originais. Por exemplo, se as células de mieloma originais não possuírem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

Células de mieloma preferidas são as que se fundem eficientemente, suportam uma produção estável de elevado nível de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo seleccionadas, e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Entre estas, as linhas celulares de mieloma preferidas são linhas de mieloma de murídeo, tais como as derivadas de tumores MOPC-21 e MPC-11 de ratinho disponíveis em Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia USA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis em American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Foram também descritas linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, "Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications", págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma estão a crescer é ensaiado quanto à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra NRR de Notch1. De preferência, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada através da análise de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Após serem identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade, e/ou actividade desejadas, os clones podem ser subclonados através de procedimentos de diluição limitante e criados através de métodos padrão (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles

and Practice", págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser criadas *in vivo* como tumores de ascites num animal.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascites, ou soro, através de procedimentos de purificação de anticorpos convencionais, tais como, por exemplo, cromatografia de proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos anti-NRR de Notch1 do invento podem ser produzidos através da utilização de bibliotecas combinatórias para pesquisar clones de anticorpos sintéticos com a actividade ou actividades desejadas. Em princípio, os clones de anticorpos sintéticos são seleccionados através de pesquisa de bibliotecas fágicas contendo fagos que exibem vários fragmentos da região variável do anticorpo (Fv) fundidos com a proteína de revestimento do fago. Tais bibliotecas fágicas são peneiradas através de cromatografia de afinidade contra o antigénio desejado. Os clones expressando fragmentos Fv capazes de se ligar ao antigénio desejado são adsorvidos ao antigénio e assim separados a partir dos clones que não se ligam na biblioteca. Os clones de ligação são então eluídos do antigénio e podem ser mais enriquecidos através de ciclos adicionais de adsorção/eluição de antigénio. Qualquer um dos anticorpos anti-NRR de Notch1 do invento pode ser obtido através da concepção de um procedimento de pesquisa do antigénio adequado para seleccionar o clone de fago de interesse seguido de construção de um clone do anticorpo inteiro anti-NRR de Notch1 utilizando as sequências de Fv do clone fágico de interesse e sequências da região constante adequadas (Fc) descritas em Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, Publicação NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

O domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo é formado por duas regiões variáveis (V) de cerca de 110 aminoácidos, uma de cada das cadeias leve (VL) e pesada (VH),

que apresentam ambas voltas hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDR). Os domínios variáveis podem ser apresentados funcionalmente no fago, como fragmentos Fv de cadeia simples (scFv), nos quais VH e VL estão covalentemente ligadas através de um péptido curto e flexível, ou como fragmentos Fab, nos quais cada um é fundido com um domínio constante e interagem de forma não covalente, tal como descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Tal como aqui utilizado, os clones fágicos codificando scFv e os clones fágicos codificando Fab são referidos colectivamente como "clones fágicos de Fv" ou "clones de Fv".

Os repertórios de genes de VH e VL podem ser clonados separadamente através de reacção em cadeia da polimerase (PCR) e recombinados aleatoriamente em bibliotecas fágicas, que podem então ser pesquisadas quanto a clones de ligação ao antigénio tal como descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). As bibliotecas de fontes imunizadas proporcionam anticorpos de elevada afinidade para o imunogénio sem a necessidade de construção de hibridomas. Alternativamente, o repertório ingénuo pode ser clonado para proporcionar uma única fonte de anticorpos humanos para uma ampla variedade de antigénios não próprios e também auto-antigénios sem qualquer imunização tal como descrito por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, bibliotecas ingénuas podem também ser produzidas sinteticamente através de clonagem dos segmentos génicos de V desarranjados de células estaminais, e utilização de iniciadores de PCR contendo sequência aleatória para codificar as regiões CDR3 altamente variáveis e para alcançar um rearranjo *in vitro* tal como descrito por Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

O fago filamentoso é utilizado para apresentar fragmentos de anticorpo por meio de fusão com a proteína de revestimento menor pIII. Os fragmentos de anticorpo podem ser apresentados como fragmentos Fv de cadeia simples, nos quais os domínios VH e VL são ligados na mesma cadeia polipeptídica através de um espaçador polipeptídico flexível, p. ex., tal como descrito por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou como fragmentos Fab, em que uma das cadeias é

fundida com pIII e a outra é segregada para o periplasma de células hospedeiras bacterianas onde a montagem de uma estrutura de proteína de revestimento de Fab é apresentada à superfície dos fagos através de deslocação de algumas das proteínas de revestimento de tipo selvagem, p. ex., tal como descrito em Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

Em geral, os ácidos nucleicos codificando os fragmentos génicos do anticorpo são obtidos a partir de células imunitárias colhidas de humanos ou animais. Se for desejada uma biblioteca que tenda a favorecer clones de anti-NRR de Notch1, o indivíduo é imunizado com NRR de Notch1 para gerar uma resposta de anticorpos, e células do baço e/ou células B em circulação e outros linfócitos de sangue periférico (PBL) são recuperados para a construção da biblioteca. Numa concretização preferida, uma biblioteca de fragmentos génicos de anticorpos humanos tendente a favorecer clones de anti-NRR de Notch1 é obtida através da geração de uma resposta de anticorpos anti-NRR de Notch1 em ratinhos transgénicos possuindo um conjunto de genes de imunoglobulinas humanas funcionais (e sem um sistema de produção de anticorpos endógenos funcionais) de modo a que a imunização com NRR de Notch1 dê origem a células B produtoras de anticorpos humanos contra NRR de Notch1. A geração de ratinhos transgénicos produtores de anticorpos humanos é descrita abaixo.

Enriquecimento adicional para populações celulares reactivas anti-NRR de Notch1 pode ser obtido através da utilização de um procedimento de pesquisa adequado para isolar células B expressando anticorpo específico de NRR de Notch1 ligado à membrana, p. ex., através de separação de células com cromatografia de afinidade para NRR de Notch1 ou adsorção de células a NRR de Notch1 marcada com fluorocromo seguida de separação de células activada por fluxo (FACS).

Alternativamente, a utilização de células do baço e/ou células B ou outros PBL de um dador não imunizado proporciona uma melhor representação do possível repertório de anticorpos, e permite também a construção de uma biblioteca de anticorpos utilizando qualquer espécie animal (humano ou não humano) em que a NRR de Notch1 não seja antigénica. Para

bibliotecas incorporando a construção génica do anticorpo *in vitro*, células estaminais são colhidas a partir do indivíduo para fornecer ácidos nucleicos codificando para segmentos génicos do anticorpo não rearranjados. As células imunitárias de interesse podem ser obtidas a partir de uma variedade de espécies animais, tais como espécies humana, ratinho, rato, lagomorfos, lupinas, caninas, felinas, suínas, bovinas, equinas, e de aves, etc.

O ácido nucleico codificando segmentos génicos variáveis de anticorpo (incluindo segmentos de VH e VL) são recuperados a partir das células de interesse e amplificados. No caso de bibliotecas génicas de VH e VL rearranjadas, o ADN desejado pode ser obtido isolando ADN genómico ou ARNm a partir de linfócitos seguido de reacção em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores correspondentes às extremidades 5' e 3' dos genes de VH e VL rearranjados tal como descrito em Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), produzindo deste modo diferentes repertórios dos genes de V para expressão. Os genes de V podem ser amplificados a partir de ADNc e ADN genómico, com iniciadores inversos na extremidade 5' do exão codificando o domínio V maduro e iniciadores directos baseados dentro do segmento J tal como descrito em Orlandi *et al.* (1989) e em Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). No entanto, para amplificação a partir de ADNc, os iniciadores inversos podem também ser baseados no exão líder tal como descrito em Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), e os iniciadores directos dentro da região constante tal como descrito em Sastry *et al.* *Proc. Natl. Acad. (EUA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar a complementaridade, pode ser incorporada degenerescência nos iniciadores tal como descrito em Orlandi *et al.* (1989) ou Sastry *et al.* (1989). De preferência, a diversidade da biblioteca é maximizada através da utilização de iniciadores de PCR direccionados a cada família de genes de V para amplificar todos os arranjos de VH e VL presentes na amostra de ácido nucleico das células imunitárias, p. ex. tal como descrito no método de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) ou tal como descrito no método de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para clonagem de ADN amplificado em vectores de expressão, locais de restrição raros podem ser introduzidos dentro do iniciador de PCR como

uma etiqueta numa extremidade tal como descrito em Orlandi *et al.* (1989), ou através de mais amplificação por PCR com um iniciador marcado tal como descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Os repertórios de genes de V rearranjados sinteticamente podem ser derivados *in vitro* a partir de segmentos génicos de V. A maioria dos segmentos de genes de VH humanos tem sido clonada e sequenciada (relatado em Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), e mapeada (relatado em Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); estes segmentos clonados (incluindo todas as principais conformações da volta H1 e H2) podem ser utilizados para gerar diversos repertórios de genes de VH com iniciadores de PCR codificando voltas H3 de diversas sequências e comprimentos tal como descrito em Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Os repertórios podem também ser produzidos com toda a diversidade da sequência focada numa longa volta H3 de uma única extensão tal como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Os segmentos Vk e Vλ humanos foram clonados e sequenciados (relatado em Williams e Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) e podem ser utilizados para produzir repertórios sintéticos de cadeias leves. Repertórios de genes de V sintéticos, com base numa variedade de voltas de VH e VL, e extensões L3 e H3, codificarão anticorpos de considerável diversidade estrutural. Após amplificação dos ADN codificando o gene de V, segmentos génicos de V da linha germinativa podem ser rearranjados *in vitro* de acordo com os métodos de Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Os repertórios de fragmentos de anticorpo podem ser construídos através da combinação de repertórios de genes de VH e VL juntos de vários modos. Cada repertório pode ser criado em diferentes vectores, e os vectores recombinados *in vitro*, p. ex., tal como descrito em Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), ou *in vivo* através de infecção combinatória, p. ex., o sistema loxP descrito em Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). A abordagem de recombinação *in vivo* explora a natureza de duas cadeias dos fragmentos Fab para superar o limite do tamanho da biblioteca imposto pela eficiência de transformação de *E.*

coli. Repertórios de VH e VL ingênuos são clonados separadamente, um num fagomídeo e o outro num vector fágico. As duas bibliotecas são então combinadas através de infecção fágica de bactérias contendo fagomídeos para que cada célula contenha uma combinação diferente e o tamanho da biblioteca seja limitado apenas pelo número de células presente (cerca de 10^{12} clones). Ambos os vectores contêm sinais de recombinação *in vivo* de modo a que os genes de VH e VL sejam recombinados num único replicação e sejam co-empacotados em viriões fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionam um grande número de diferentes anticorpos de boa afinidade (K_d^{-1} de cerca de 10^{-8} M).

Alternativamente, os repertórios podem ser clonados sequencialmente no mesmo vector, p. ex., tal como descrito em Barbas *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 88: 7978-7982 (1991), ou montados em conjunto através de PCR e depois clonados, p. ex., tal como descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). A montagem por PCR pode também ser utilizada para unir ADN de VH e VL com ADN codificando um espaçador peptídico flexível para formar repertórios de Fv de cadeia simples (scFv). Ainda noutra técnica, é utilizada "montagem por PCR em célula" para combinar genes de VH e VL dentro de linfócitos através de PCR e depois clonar repertórios de genes ligados tal como descrito em Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Os anticorpos produzidos por bibliotecas ingênuas (naturais ou sintéticas) podem ser de afinidade moderada (K_d^{-1} de cerca de 10^6 a 10^7 M⁻¹), mas a maturação da afinidade pode também ser imitada *in vitro* através da construção e re-selecção a partir de bibliotecas secundárias tal como descrito em Winter *et al.* (1994), *supra*. Por exemplo, podem ser introduzidas mutações aleatoriamente *in vitro* através da utilização de polimerase tendente a erro (relatado em Leung *et al.*, *Technique*, 1: 11-15 (1989)) no método de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) ou no método de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, a maturação da afinidade pode ser realizada através da mutação aleatória de uma ou mais CDR, p. ex. utilizando PCR com iniciadores possuindo uma sequência aleatória abrangendo a CDR de interesse, em clones

individuais de Fv seleccionados e pesquisa de clones de afinidade mais elevada. WO 96/07754 (publicado a 14 de Março de 1996) descreveu um método para indução de mutagénese numa região determinante de complementaridade de uma cadeia leve de imunoglobulina para criar uma biblioteca de genes de cadeia leve. Outra abordagem eficaz é recombinar os domínios VH ou VL seleccionados através de apresentação fágica com repertórios de variantes do domínio V de ocorrência natural obtidas a partir de dadores não imunizados e pesquisa de maior afinidade em vários ciclos de baralhamento de cadeias tal como descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpo com afinidades no intervalo de 10^{-9} M.

As sequências de ácido nucleico e aminoácidos de NRR de Notch1 são conhecidas na técnica. A sequência de ácido nucleico codificando a NRR de Notch1 pode ser concebida utilizando a sequência de aminoácidos da região desejada de NRR de Notch1. As sequências podem incluir a sequência de SEQ ID NOS:55, 13, ou 14. Alternativamente, pode ser utilizada a sequência de ADNc (ou fragmentos desta) de No. de Acesso GenBank NM_017617. Os ácidos nucleicos codificando a NRR de Notch1 podem ser preparados através de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, síntese química através de qualquer um dos métodos descritos em Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed Engl.*, 28: 716-734 (1989); tais como os métodos de triéster, fosfite, fosforamidite e H-fosfonato. Numa concretização, os codões preferidos pela célula hospedeira de expressão são utilizados no desenho do ADN codificando a NRR de Notch1. Alternativamente, o ADN codificando a NRR de Notch1 pode ser isolado a partir de uma biblioteca genómica ou de ADNc.

Após construção da molécula de ADN codificando a NRR de Notch1, a molécula de ADN é operativamente ligada a uma sequência de controlo da expressão num vector de expressão, tal como um plasmídeo, em que a sequência de controlo é reconhecida por uma célula hospedeira transformada com o vector. Em geral, os vectores plasmídicos contêm sequências de replicação e de controlo que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira. O vector possui

vulgarmente um local de replicação, bem como sequências que codificam proteínas que são capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas. Vectores adequados para expressão em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas são conhecidos na técnica e alguns são ainda aqui descritos. Organismos eucarióticos, tais como leveduras, ou células derivadas de organismos multicelulares, tais como mamíferos, podem ser utilizados.

Opcionalmente, o ADN codificando a NRR de Notch1 é operativamente ligado a uma sequência líder de secreção resultando na secreção do produto de expressão pela célula hospedeira para o meio de cultura. Exemplos de sequências líder de secreção incluem stII, ecotin, lamB, GD de herpes, lpp, fosfatase alcalina, invertase, e factor alfa. Também adequada para utilização aqui é a sequência líder de 36 aminoácidos da proteína A (Abrahmsen *et al.*, *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

As células hospedeiras são transfectadas e de preferência transformadas com os vectores de expressão ou de clonagem acima descritos deste invento e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para indução de promotores, selecção de transformantes, ou amplificação dos genes codificando as sequências desejadas.

A transfecção refere-se à tomada de um vector de expressão por uma célula hospedeira quer sejam ou não expressas realmente quaisquer sequências de codificação. Numerosos métodos de transfecção são conhecidos do vulgar perito, por exemplo, precipitação em CaPO_4 e electroporação. A transfecção bem sucedida é em geral reconhecida quando ocorre qualquer indicação da operação deste vector dentro da célula hospedeira. Os métodos para transfecção são bem conhecidos na técnica, e alguns são ainda aqui descritos.

A transformação significa a introdução de ADN num organismo de modo a que o ADN seja replicável, quer como um elemento extracromossómico quer como integrante cromossómico. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é feita utilizando técnicas padrão apropriadas para tais

células. Os métodos para transformação são bem conhecidos na técnica, e alguns são aqui adicionalmente descritos.

As células hospedeiras procarióticas utilizadas para produzir a NRR de Notch1 podem ser cultivadas tal como descrito geralmente em Sambrook *et al. supra*.

As células hospedeiras de mamífero utilizadas para produzir a NRR de Notch1 podem ser cultivadas numa variedade de meios, o que é bem conhecido na técnica e alguns dos quais são aqui descritos.

As células hospedeiras referidas nesta divulgação englobam células em cultura *in vitro*, bem como células que estão dentro de um animal hospedeiro.

A purificação de NRR de Notch1 pode ser realizada utilizando métodos reconhecidos da técnica, alguns dos quais estão aqui descritos.

A NRR de Notch1 purificada pode ser ligada a uma matriz adequada tal como contas de agarose, contas de acrilamida, contas de vidro, celulose, vários copolímeros acrílicos, géis de metacrilato de hidroxilo, copolímeros poliacrílicos e polimetacrílicos, nylon, transportadores neutros e iónicos e semelhantes, para utilização na separação cromatográfica de afinidade de clones de apresentação fágica. A ligação da proteína NRR de Notch1 à matriz pode ser conseguida através de métodos descritos em *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Uma técnica frequentemente empregue para unir ligandos proteicos a matrizes polissacarídicas, p. ex., agarose, dextrano ou celulose, envolve a activação do transportador com halogenetos de cianogénio e subsequente acoplamento das aminas primárias alifáticas ou aromáticas do ligando à matriz activada.

Alternativamente, a NRR de Notch1 pode ser utilizada para revestir os poços de placas de adsorção, expressa em células hospedeiras fixadas em placas de adsorção ou utilizadas em separação de células, ou conjugada com biotina para captura com contas revestidas com estreptavidina, ou

utilizada em qualquer outro método conhecido na técnica para peneiração de bibliotecas de apresentação fágica.

As amostras de bibliotecas fágicas são colocadas em contacto com NRR de Notch1 imobilizada, sob condições adequadas para ligação de pelo menos uma porção das partículas fágicas com o adsorvente. Normalmente, as condições, incluindo pH, força iónica, temperatura e semelhantes, são seleccionadas para imitar as condições fisiológicas. Os fagos ligados à fase sólida são lavados e, em seguida, eluídos com ácido, p. ex., tal como descrito em Barbas *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 88: 7978-7982 (1991), ou alcali, p. ex., tal como descrito em Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou através de competição do antígeno NRR de Notch1, p. ex. num procedimento semelhante ao do método de competição do antígeno de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Os fagos podem ser enriquecidos 20-1000 vezes num único ciclo de selecção. Além disso, os fagos enriquecidos podem ser criados em cultura bacteriana e submetidos a mais ciclos de selecção.

A eficiência de selecção depende de muitos factores, incluindo a cinética de dissociação durante lavagem, e de se múltiplos fragmentos de anticorpo num único fago podem estar envolvidos simultaneamente com o antígeno. Anticorpos com uma cinética de dissociação rápida (e fracas afinidades de ligação) podem ser retidos através da utilização de lavagens curtas, apresentação fágica multivalente e elevada densidade de revestimento de antígeno em fase sólida. A alta densidade não só estabiliza o fago através de interacções multivalentes, como favorece a re-ligação do fago que se dissociou. A selecção de anticorpos com uma cinética de dissociação lenta (e boas afinidades de ligação) pode ser promovida através da utilização de lavagens longas e apresentação fágica monovalente tal como descrito em Bas *et al.* *Proteins*, 8: 309-314 (1990) e em WO 92/09690, e uma baixa densidade de revestimento de antígeno, tal como descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783. (1992).

É possível seleccionar entre anticorpos fágicos de diferentes afinidades, mesmo com afinidades que diferem ligeiramente, para NRR de Notch1. No entanto, a mutação

aleatória de um anticorpo seleccionado (p. ex. tal como realizada nalgumas das técnicas de maturação de afinidade descritas acima) é provável que dê origem a muitos mutantes, a maioria ligando-se ao antigénio, e poucos com maior afinidade. Com NRR de Notch1 limitante, raros fagos de alta afinidade podem competir. Para manter todos os mutantes de maior afinidade, os fagos podem ser incubados com excesso de NRR de Notch1 biotinilada, mas com a NRR de Notch1 biotinilada numa concentração de menor molaridade do que a constante de afinidade molar alvo para NRR de Notch1. Os fagos de alta afinidade de ligação podem então ser capturados por contas paramagnéticas revestidas com estreptavidina. Tal "captura em equilíbrio" permite que os anticorpos sejam seleccionados de acordo com as suas afinidades de ligação, com sensibilidade que permite o isolamento de clones mutantes com apenas duas vezes mais afinidade a partir de um grande excesso de fagos com menor afinidade. As condições usadas na lavagem dos fagos ligados a uma fase sólida podem também ser manipuladas para discriminar com base na cinética de dissociação.

Os clones anti-NRR de Notch1 podem ser seleccionados pela actividade. Numa concretização, o invento proporciona anticorpos anti-NRR de Notch1 que bloqueiam a ligação entre um receptor Notch1 e o seu ligando (tal como Jagged1, Jagged2, Delta-like1, Delta-like3, e Delta-like4) ou a clivagem proteolítica da Notch1 induzida após ligação do ligando. Os clones Fv correspondendo a tais anticorpos anti-NRR de Notch1 podem ser seleccionados através de (1) isolamento de clones anti-NRR de Notch1 a partir de uma biblioteca fágica tal como descrito acima, e, opcionalmente, amplificação da população isolada dos clones fágicos através de criação da população num hospedeiro bacteriano adequado; (2) selecção de NRR de Notch1 e uma segunda proteína contra a qual é desejada actividade de bloqueio e não bloqueio, respectivamente; (3) adsorção dos clones fágicos anti-NRR de Notch1 a NRR de Notch1 imobilizada; (4) utilização de um excesso da segunda proteína para eluir quaisquer clones indesejados que reconheçam determinantes de ligação a NRR de Notch1 que se sobreponham ou sejam partilhados com os determinantes da ligação da segunda proteína; e (5) eluição dos clones que permanecem adsorvidos após o passo (4).

Opcionalmente, os clones com as propriedades de bloqueio/não bloqueio desejadas podem ser ainda enriquecidos através da repetição dos procedimentos de selecção aqui descritos uma ou mais vezes.

O ADN codificando os anticorpos monoclonais derivados de hibridoma ou clones de Fv de apresentação fágica do invento é prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (p. ex., através da utilização de iniciadores oligonucleotídicos concebidos para amplificar especificamente as regiões de codificação da cadeia pesada e leve de interesse a partir do hibridoma ou molde de ADN fágico). Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outro modo não produzem proteína imunoglobulina, para se obter a síntese dos anticorpos monoclonais desejados nas células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de ADN codificando anticorpos incluem Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) e Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992).

O ADN codificando os clones de Fv do invento podem ser combinados com sequências de ADN conhecidas codificando regiões constantes da cadeia pesada e/ou cadeia leve (p. ex., as sequências de ADN apropriadas podem ser obtidas a partir de Kabat *et al.*, *supra*) para formar clones codificando cadeias pesadas e/ou leves inteiras ou parciais. Será apreciado que as regiões constantes de qualquer isotipo podem ser utilizadas para este fim, incluindo regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que tais regiões constantes podem ser obtidas a partir de qualquer espécie humana ou animal. Um clone de Fv derivado do ADN do domínio variável de uma espécie animal (tal como a humana) e depois fundido com o ADN da região constante de outra espécie animal para formar a ou as sequências de codificação para a cadeia pesada e/ou cadeia leve inteira "híbrida" está incluída na definição de anticorpo "quimérico" e "híbrido", tal como aqui utilizado. Numa concretização preferida, um clone Fv derivado de ADN variável humano é fundido com ADN da região constante humana

para formar a ou as sequências de codificação para todas as cadeias pesadas e/ou leves inteiras ou parciais humanas.

O ADN codificando o anticorpo anti-NRR de Notch1 derivado de um hibridoma do invento pode também ser modificado, por exemplo, através da substituição da sequência de codificação para domínios constantes de cadeia pesada e leve humana em vez de sequências de murídeo homólogas derivadas do clone de hibridoma (p. ex., tal como no método de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). O ADN codificando um anticorpo ou fragmento derivado de hibridoma ou clone de Fv pode ainda ser modificado através de união covalente à sequência de codificação de imunoglobulina de toda ou parte da sequência de codificação para um polipéptido não imunoglobulina. Deste modo, são preparados anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" que possuem a especificidade de ligação de anticorpos derivados do clone de hibridoma ou do clone de Fv do invento.

Fragments de Anticorpo

O presente invento engloba fragmentos de anticorpo. Em certas circunstâncias existem vantagens da utilização de fragmentos de anticorpo, em vez de anticorpos inteiros. O menor tamanho dos fragmentos permite uma rápida eliminação e pode conduzir a um melhor acesso a tumores sólidos.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados através de digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, p. ex., Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Métodos* 24: 107-117 (1992); e Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)). No entanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos directamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos de anticorpo Fab, Fv e ScFv podem todos ser expressos em, e segregados a partir de *E. coli*, permitindo assim a produção fácil de grandes quantidades destes fragmentos. Os fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir das bibliotecas fágicas de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser directamente recuperados a partir de *E. coli* e ligados quimicamente para formar

fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos $F(ab')_2$ podem ser isolados directamente a partir de cultura de células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ com maior semivida *in vivo* compreendendo um receptor de salvamento que se liga a resíduos do epitopo são descritos na Pat. U.S. No. 5869046. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão aparentes ao perito. Em outras concretizações, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia simples (scFv) (ver, p. ex., WO 93/16185; Pat. U.S. Nos. 5571894 e 5587458). Fv e sFv são as únicas espécies com locais de combinação intactos que são desprovidos de regiões constantes; assim, eles são adequados para reduzida ligação não específica durante o uso *in vivo*. As proteínas de fusão sFv podem ser construídas de modo a produzir a fusão de uma proteína efectora, ao terminal amino ou carboxilo de um sFv. Ver "Antibody Engineering", ed. Borrebaeck, *supra*. O fragmento de anticorpo pode também ser um "anticorpo linear", p. ex., tal como descrito, por exemplo, na Pat. U.S. No. 5641870. Tais fragmentos de anticorpo lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

Anticorpos Humanizados

O presente invento engloba anticorpos humanizados. Vários métodos para humanização de anticorpos não humanos são conhecidos na técnica. Por exemplo, um anticorpo humanizado pode ter um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele a partir de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente referidos como resíduos "importados", que são tipicamente tomados a partir de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239: 1534-1536), através da substituição por sequências da região hipervariável das correspondentes sequências de um anticorpo humano. Por conseguinte, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. No. 4816567) em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os

anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos da região hipervariável e possivelmente alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedor.

A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves como pesados, para serem utilizados na preparação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o método chamado "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é pesquisada contra toda a biblioteca de sequências de domínio variável humanas conhecidas. A sequência humana que está mais próxima da do roedor é então aceite como a estrutura humana para o anticorpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901). Outro método utiliza uma determinada estrutura derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um determinado subgrupo de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623).

É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de elevada afinidade para o antigénio e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objectivo, de acordo com um método, os anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise das sequências originais e vários produtos humanizados conceptuais utilizando modelos tridimensionais das sequências original e humanizada. Modelos tridimensionais de imunoglobulinas estão vulgarmente disponíveis e são familiares dos peritos na técnica. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e apresentam estruturas prováveis de conformação tridimensional de sequências de imunoglobulina candidatas seleccionadas. A inspecção destas apresentações permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, i.e., a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata para se ligar ao seu antigénio. Deste modo, podem ser seleccionados e combinados resíduos FR do receptor e das sequências importadas, para que

a característica desejada do anticorpo, tal como afinidade aumentada para o ou os antígenos alvo, seja alcançada. Em geral, os resíduos da região hipervariável estão directamente e muito substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antígeno.

Anticorpos Humanos

Os anticorpos humanos anti-NRR de Notch1 do invento podem ser construídos através da combinação da sequência ou sequências de domínio variável dos clones de Fv seleccionadas a partir de bibliotecas de apresentação fágica derivadas de humanos com uma ou mais sequências do domínio constante humanas conhecidas tal como descrito acima. Alternativamente, anticorpos monoclonais humanos anti-NRR de Notch1 do invento podem ser produzidos através do método de hibridoma. As linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma rato-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritas, por exemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, "Antibody monoclonal Production Techniques and Applications", págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); e Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

É agora possível produzir animais transgénicos (p. ex., ratinhos) que são capazes, após imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de junção da cadeia pesada do anticorpo (JH) em ratinhos mutantes quiméricos de linha germinativa resulta em completa inibição da produção de anticorpos endógenos. A transferência da série génica de imunoglobulinas da linha germinativa humana para tais ratinhos mutantes da linha germinativa resultará na produção de anticorpos humanos após confronto com o antígeno. Ver, p. ex., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

O baralhamento de genes pode também ser utilizado para derivar anticorpos humanos a partir de anticorpos não

humanos, p. ex., de roedor, quando o anticorpo humano tem afinidades e especificidades semelhantes às do anticorpo não humano de partida. De acordo com este método, que é também denominado "*imprinting* do epitopo", a região variável da cadeia pesada ou leve de um fragmento de anticorpo não humano obtida através de técnicas de apresentação fágica tal como descrito acima é substituída com um repertório de genes do domínio V humano, criando uma população de quimeras de scFv ou Fab de cadeia não humana/cadeia humana. A selecção com antigénio resulta em isolamento de um scFv ou Fab quimérico de cadeia não humana/cadeia humana em que a cadeia humana restaura o local de ligação ao antigénio destruído após remoção da correspondente cadeia não humana no clone de apresentação fágica primário, i.e. o epitopo governa (*imprints*) a escolha do parceiro da cadeia humana. Quando o processo é repetido para substituir a restante cadeia não humana, é obtido um anticorpo humano (ver PCT WO 93/06213 publicada a 1 de Abril de 1993). Ao contrário da humanização tradicional de anticorpos não humanos através de enxerto de CDR, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, que não possuem resíduos FR ou CDR de origem não humana.

Anticorpos Biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, de preferência humanos ou humanizados, anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para NRR de Notch1 e a outra é para qualquer outro antigénio. Anticorpos biespecíficos exemplares podem ligar-se a dois epitopos diferentes da NRR de Notch1. Os anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para localizar agentes citotóxicos em células que expressem NRR de Notch1. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a NRR de Notch1 e um braço que se liga ao agente citotóxico (p. ex., saporina, anti-interferão- α , alcalóide vinca, cadeia A de rícino, metotrexato ou isótopo radioactivo hapteno). Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos intactos ou fragmentos de anticorpo (p. ex., anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

Os métodos para produção de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é com base na co-expressão de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina, quando as duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes (Milstein e Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Devido ao arranjo aleatório de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma potencial mistura de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta, que é usualmente realizada através de passos de cromatografia de afinidade, é bastante complicada, e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos semelhantes são divulgados em WO 93/08829 publicada a 13 de Maio de 1993 e em Traunecker *et al.* *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente e mais preferida, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação anticorpo-antigénio) são fundidos com sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão é de preferência com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões charneira, CH2 e CH3. É preferível ter a primeira região constante da cadeia pesada (CH1), contendo o local necessário para ligação à cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN codificando as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vectores de expressão separados, e são co-transfectados num organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona uma grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos polipeptídicos em concretizações quando razões desiguais das três cadeias polipeptídicas utilizadas na construção proporcionam rendimentos óptimos. É, no entanto, possível inserir sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias polipeptídicas num vector de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em razões iguais resulta em rendimentos elevados ou quando as proporções não têm um significado particular.

Numa abordagem preferida, os anticorpos biespecíficos são compostos por uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação num braço, e um par híbrido de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina (proporcionando uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Verificou-se que esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado das combinações de cadeias de imunoglobulina indesejadas, uma vez que a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica proporciona um modo fácil de separação. Esta abordagem é divulgada em WO 94/04690. Para mais detalhes sobre a geração de anticorpos biespecíficos ver, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acordo com outra abordagem, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser manipulada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura de células recombinantes. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (p. ex., tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou semelhante à ou às cadeias laterais grandes são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo através de substituição de grandes cadeias laterais de aminoácidos por cadeias menores (p. ex., alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumento do rendimento do heterodímero em relação a outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro a biotina. Tais anticorpos foram propostos, por exemplo, para dirigir células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente US No. 4676980), e para tratamento de infecção por HIV (WO 91/00360 e EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser produzidos utilizando quaisquer métodos convenientes de reticulação. Os agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica, e são

divulgados na Patente US No. 4676980, juntamente com várias técnicas de reticulação.

As técnicas para geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo foram também descritas na literatura. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos podem ser preparados utilizando ligação química. Brennan *et al. Science*, 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante ditiol, arsenito de sódio para estabilizar ditióis vizinhos e prevenir a formação de dissulfuretos intermoleculares. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab' -TNB é então reconvertido no Fab' -tiol através de redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização selectiva de enzimas.

Progressos recentes facilitaram a recuperação directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que podem ser ligados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al., J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula $F(ab')_2$ de anticorpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' foi segregado separadamente a partir de *E. coli* e submetido a acoplamento químico directo *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar a células sobre-expressando o receptor HER2 e células T humanas normais, bem como de desencadear a actividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos em tumores da mama humanos.

Várias técnicas para produzir e isolar fragmentos de anticorpo biespecíficos directamente a partir de cultura de células recombinantes foram também descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos utilizando fechos de leucina. Kostelny *et al. J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Os péptidos do fecho de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos

diferentes através de fusão génica. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região charneira para formar monómeros e, em seguida, reoxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpos" descrita por Hollinger *et al.* *Proc. Natl. Acad. EUA*, 90: 6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para produzir fragmentos de anticorpo biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável de cadeia leve (VL) através de um ligador que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Concomitantemente, os domínios VH e VL de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios VL e VH complementares de outro fragmento, formando deste modo dois locais de ligação ao antigénio. Outra estratégia para produzir fragmentos de anticorpo biespecíficos através da utilização de dímeros de Fv de cadeia simples (sFv) foi também relatada. Ver Gruber *et al.* *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Anticorpos com mais de duas valências estão contemplados. Por exemplo, podem ser preparados anticorpos triespecíficos. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Anticorpos Multivalentes

Um anticorpo multivalente pode ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rapidamente que um anticorpo bivalente através de uma célula expressando um antigénio ao qual os anticorpos se ligam. Os anticorpos do presente invento podem ser anticorpos multivalentes (que são outros que não da classe IgM) com três ou mais locais de ligação ao antigénio (p. ex., anticorpos tetravalentes), que podem ser facilmente produzidos através de expressão recombinante de ácido nucleico codificando as cadeias polipeptídicas do anticorpo. O anticorpo multivalente pode compreender um domínio de dimerização e três ou mais locais de ligação ao antigénio. O domínio de dimerização preferido compreende (ou consiste em) uma região Fc ou uma região charneira. Neste cenário, o anticorpo compreenderá uma região Fc e três ou mais locais de ligação a antigénios amino-terminais à região Fc. O anticorpo

multivalente preferido aqui compreende (ou consiste em) três a cerca de oito, mas de preferência quatro, locais de ligação a antígenos. O anticorpo multivalente compreende pelo menos uma cadeia polipeptídica (e de preferência duas cadeias polipeptídicas), em que a ou as cadeias polipeptídicas compreendem dois ou mais domínios variáveis. Por exemplo, a ou as cadeias polipeptídicas podem compreender $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, em que $VD1$ é um primeiro domínio variável, $VD2$ é um segundo domínio variável, Fc é uma cadeia polipeptídica de uma região Fc , $X1$ e $X2$ representam um aminoácido ou polipeptídeo, e n é 0 ou 1. Por exemplo, a ou as cadeias polipeptídicas podem compreender: cadeia $VH-CH1$ -ligador flexível- $VH-CH1$ -região Fc ; ou cadeia $VH-CH1-VH-CH1$ -região Fc . O anticorpo multivalente daqui compreende ainda de preferência pelo menos dois (e de preferência quatro) polipeptídeos de domínio variável da cadeia leve. O anticorpo multivalente daqui pode, por exemplo, compreender de cerca de dois a cerca de oito polipeptídeos de domínio variável da cadeia leve. Os polipeptídeos de domínio variável da cadeia leve aqui contemplados compreendem um domínio variável da cadeia leve e, opcionalmente, compreendem ainda um domínio CL .

Variantes de Anticorpo

A ou as modificações da sequência de aminoácidos dos anticorpos aqui descritos são tal como definidas nas reivindicações. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. Variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo são preparadas através da introdução de alterações nucleotídicas apropriadas no ácido nucleico do anticorpo, ou através de síntese peptídica. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em e/ou substituições de, resíduos dentro das sequências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção, e substituição é feita para se chegar à construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As alterações de aminoácidos podem ser introduzidas na sequência de aminoácidos do anticorpo sujeito na altura em que essa sequência é produzida.

Um método útil para identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferidas para mutagénese é denominado "mutagénese de varrimento de alanina", tal como descrito por Cunningham e Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. Aqui, é identificado um resíduo ou grupo de resíduos alvo (p. ex., resíduos carregados tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituídos por um aminoácido neutro ou de carga negativa (de maior preferência alanina ou polialanina) para afectar a interacção dos aminoácidos com o antigénio. As localizações de aminoácidos demonstrando sensibilidade funcional às substituições são então refinadas através da introdução de mais ou outras variantes em, ou para, os locais de substituição. Assim, embora o local para introdução de uma variação da sequência de aminoácidos seja predeterminado, a natureza da mutação *per se* não precisa de estar predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação num dado local, mutagénese por varrimento de ala ou aleatória é conduzida no codão ou região alvo e as imunoglobulinas expressas são pesquisadas quanto à actividade desejada.

As inserções de sequências de aminoácidos incluem fusões amino e/ou carboxi-terminais que variam em comprimento de um resíduo a polipéptidos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequência de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionilo N-terminal ou o anticorpo fundido com um polipéptido citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão do terminal N ou C do anticorpo com uma enzima (p. ex., para ADEPT) ou um polipéptido que aumente a semivida sérica do anticorpo.

A glicosilação de polipéptidos é tipicamente ou ligada em N ou ligada em O. Ligada em N refere-se à ligação da porção hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido excepto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da porção hidrato de carbono à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de qualquer uma destas sequências tripeptídicas num polipéptido cria um potencial

local de glicosilação. A glicosilação ligada em O refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais vulgarmente serina ou treonina, embora também possam ser utilizados 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição de locais de glicosilação ao anticorpo é convenientemente conseguida através da alteração da sequência de aminoácidos de modo a que contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas acima descritas (para locais de glicosilação ligada em N). A alteração pode também ser feita através da adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação ligada em O).

Quando o anticorpo compreende uma região Fc, o hidrato de carbono ligado a este pode ser alterado. Por exemplo, anticorpos com uma estrutura de hidrato de carbono madura sem fucose ligada a uma região Fc do anticorpo são descritos no Pedido de Patente US 2003/0157108 (Presta, L.). Ver também US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Anticorpos com uma bissectriz de N-acetilglucosamina (GlcNAc) no hidrato de carbono ligado a uma região Fc do anticorpo são referenciados em WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* e Patente US No. 6602684, Umana *et al.* Anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose no oligossacárido ligado a uma região Fc do anticorpo são relatados em WO 1997/30087, Patel *et al.* Ver, também, WO 1998/58964 (Raju, S.) e WO 1999/22764 (Raju, S.) sobre anticorpos com hidrato de carbono alterado ligado à região Fc destes. Ver também US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de ligação ao antigénio com glicosilação modificada.

A variante de glicosilação preferida aqui compreende uma região Fc, em que uma estrutura de hidrato de carbono ligada à região Fc não possui fucose. Tais variantes têm função de ADCC melhorada. Opcionalmente, a região Fc compreende ainda uma ou mais substituições de aminoácidos aí que melhoram mais a ADCC, por exemplo, substituições nas posições 298, 333, e/ou 334 da região Fc (numeração Eu dos resíduos). Exemplos de publicações relacionadas com anticorpos "desfucosilados" ou "deficientes em fucose" incluem: US 2003/0157108; WO

2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Exemplos de linhas celulares produtoras de anticorpos desfucosilados incluem células CHO Lec13 deficientes em fucosilação de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); Ped. de Pat. US No US 2003/0157108 A1, Presta, L; e WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente no Exemplo 11), e linhas celulares *knock-out*, tais como células CHO *knock-out* para o gene da alfa-1,6-fucosiltransferase, *FUT8*, (Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácidos na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os locais de maior interesse para mutagénese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações em FR estão também contempladas. Substituições conservativas são mostradas na Tabela 1, sob o título de "substituições preferidas". Se tais substituições resultarem numa mudança na actividade biológica, então alterações mais substanciais, denominadas "substituições exemplares" na Tabela 1, ou tal como melhor descrito abaixo em referência às classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos pesquisados.

Tabela 1

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

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são alcançadas através de selecção de substituições que diferem significativamente no seu efeito na manutenção (a) da estrutura do esqueleto do polipéptido na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base em propriedades comuns da cadeia lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

As substituições não conservativas implicarão a troca de um membro de uma destas classes por outra classe.

Um tipo de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo original (p. ex., um anticorpo humanizado ou humano). Em geral, a ou as variantes resultantes seleccionadas para mais desenvolvimento terão propriedades biológicas melhoradas relativamente ao anticorpo original a partir do qual são geradas. Uma maneira conveniente para gerar tais variantes de substituição envolve a maturação da afinidade utilizando apresentação fágica. Resumidamente, vários locais da região hipervariável (p. ex., 6-7 locais) são mutados para gerar todas as possíveis substituições de aminoácidos em cada local. Os anticorpos assim gerados são apresentados a partir de partículas filamentosas como fusões para o produto do gene III de M13 empacotado no interior de cada partícula. As variantes apresentadas em fagos são então pesquisadas quanto à sua actividade biológica (p. ex., afinidade de ligação) tal como aqui divulgado. Para identificar locais candidatos da região hipervariável para modificação, pode ser realizada mutagénese por varrimento de alaninas para identificar os resíduos da região hipervariável que contribuem significativamente para a ligação ao antigénio. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo antigénio-anticorpo para identificar pontos de contacto entre o anticorpo e o antigénio. Tais resíduos de contacto e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas aqui elaboradas. Uma vez geradas tais variantes, o painel de variantes é submetido a rastreio tal como aqui descrito e os anticorpos com propriedades superiores num ou mais ensaios relevantes podem ser seleccionadas para posterior desenvolvimento.

Moléculas de ácido nucleico codificando variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo são preparadas através de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de sequências de aminoácidos de ocorrência natural) ou

preparação através de mutagénese mediada por oligonucleótidos (ou dirigida ao local), mutagénese por PCR, e mutagénese por cassete de uma variante preparada anteriormente ou uma versão não variante do anticorpo.

Pode ser desejável introduzir uma ou mais modificações de aminoácidos numa região Fc dos polipéptidos de imunoglobulina do invento, gerando assim uma variante da região Fc. A variante da região Fc pode compreender uma sequência da região Fc humana (p. ex., uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana) compreendendo uma modificação de aminoácido (p. ex., uma substituição) em uma ou mais posições de aminoácidos, incluindo a de uma cisteína charneira.

De acordo com esta descrição e os ensinamentos da técnica, está contemplado que em alguns aspectos um anticorpo pode compreender uma ou mais alterações, em comparação com o anticorpo correspondente de tipo selvagem, p. ex., na região Fc. Estes anticorpos manteriam, contudo, substancialmente as mesmas características requeridas para utilidade terapêutica em comparação com o seu tipo selvagem correspondente. Por exemplo, pensa-se que certas alterações possam ser feitas na região Fc que resultariam em ligação a Clq alterada (i.e., melhorada ou diminuída) e/ou Citotoxicidade Dependente do Complemento (CDC), p. ex., tal como descrito em WO99/51642. Ver também Duncan & Winter *Nature* 322: 738-40 (1988); Patente US No. 5648260; Patente US No. 5624821; e WO94/29351 em relação a outros exemplos de variantes da região Fc. WO 00/42072 (Presta) e WO 2004/056312 (Lowman) descrevem variantes de anticorpo com uma ligação a FcR melhorada ou diminuída. O conteúdo destas publicações de patente é aqui especificamente incorporado por referência. Ver, também, Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Anticorpos com maiores semividas e melhor ligação ao receptor de Fc neonatal (FcRn), que é responsável pela transferência de IgG maternas para o feto (Guyer *et al. J. Immunol.* 117: 587 (1976) e Kim *et al. J. Immunol.* 24: 249 (1994)), estão descritos em US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estes anticorpos compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições nela que melhoram a ligação da região Fc a FcRn. Variantes polipeptídicas com sequências de aminoácidos da região Fc alteradas e capacidade de ligação a Clq

aumentada ou diminuída são descritas na patente US No. 6194551B1, WO 99/51642. Ver, também, Idusogie et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Derivados de Anticorpo

Os anticorpos do presente invento podem ainda ser modificados para conter porções não proteínáceas adicionais que são conhecidas na técnica e facilmente disponíveis. De preferência, as porções adequadas para derivatização do anticorpo são polímeros solúveis em água. Exemplos não limitantes de polímeros solúveis em água incluem, mas não estão limitados a, polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etilenoglicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros ou copolímeros aleatórios), e dextrano ou poli(n-vinilpirrolidona)polietilenoglicol, homopolímeros de propilenoglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polióis polioxietilados (p. ex., glicerol), álcool polivinílico, e misturas destes. O propionaldeído de polietilenoglicol pode ter vantagens no fabrico devido à sua estabilidade em água. O polímero pode ser de qualquer peso molecular, e pode ser ramificado ou não ramificado. O número de polímeros ligados ao anticorpo pode variar, e se estiver ligado mais de um polímero, estes podem ser a mesma molécula ou moléculas diferentes. Em geral, o número e/ou tipo de polímero utilizado para derivatização pode ser determinado com base em considerações incluindo, mas não se limitando a, as propriedades ou funções particulares do anticorpo a melhorar, se o derivado de anticorpo será utilizado numa terapia sob condições definidas, etc.

Pesquisa de anticorpos com propriedades desejadas

Os anticorpos do presente invento podem ser caracterizados pelas suas propriedades físicas/químicas e funções biológicas através de vários ensaios conhecidos na técnica. Nalgumas concretizações, os anticorpos são caracterizados para qualquer uma ou mais de redução ou bloqueio da activação de Notch1, redução ou bloqueio da

sinalização molecular a jusante de Notch1, perturbação ou bloqueio da ligação de Notch1 a um ligando (p. ex., Jagged1, Jagged2, Delta-like1, Delta-like3, ou Delta-like4), e/ou tratamento e/ou prevenção de um tumor, distúrbio proliferativo celular ou um cancro; e/ou tratamento ou prevenção de um distúrbio associado a expressão de Notch1 e/ou actividade (tais como maior expressão e/ou actividade de Notch1). Os anticorpos são caracterizados para qualquer um ou mais de indução ou aumento da activação de Notch1, indução ou aumento da sinalização molecular a jusante de Notch1, e/ou tratamento ou prevenção de um distúrbio associado a expressão e/ou actividade de Notch1.

Os anticorpos purificados podem ainda ser caracterizados através de uma série de ensaios incluindo, mas não se limitando a, sequenciação N-terminal, análise de aminoácidos, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de exclusão de tamanho não desnaturante, espectrometria de massa, cromatografia de permuta iónica e digestão com papaína.

Os anticorpos aqui produzidos são analisados quanto à sua actividade biológica. Os anticorpos do presente invento são testados quanto à sua actividade de ligação ao antigénio. Os ensaios de ligação ao antigénio que são conhecidos na técnica e podem ser aqui utilizados incluem sem limitação quaisquer ensaios de ligação directa ou competitiva utilizando técnicas tais como *western blots*, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunossorvente ligado a enzima), imunoensaios em "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, imunoensaios fluorescentes, e imunoensaios de proteína A. Ensaios de ligação ao antigénio ilustrativos são proporcionados abaixo na secção dos Exemplos.

Ainda noutra concretização, o invento proporciona anticorpos monoclonais anti-NRR de Notch1 que competem com o Anticorpo **A**, Anticorpo **A-1**, Anticorpo **A-2** e/ou Anticorpo **A-3** pela ligação a NRR de Notch1. Tais anticorpos competidores incluem anticorpos que reconhecem um epitopo de NRR de Notch1 que é o mesmo ou se sobrepõe com o epitopo de NRR de Notch1 reconhecido pelo Anticorpo **A**, Anticorpo **A-1**, Anticorpo **A-2**, e/ou Anticorpo **A-3**. Tais anticorpos competidores podem ser obtidos através de pesquisa de sobrenadantes de hibridoma de

anti-NRR de Notch1 pela ligação a NRR de Notch1 imobilizada em competição com Anticorpo **A**, Anticorpo **A-1**, Anticorpo **A-2**, e/ou Anticorpo **A-3** marcados. Um sobrenadante de hibridoma contendo anticorpo competidor reduzirá a quantidade de anticorpo marcado ligado detectada na mistura de ligação de competição sujeita em comparação com a quantidade de anticorpo marcado ligado detectada numa mistura de ligação de controlo contendo anticorpo irrelevante (ou não). Qualquer um dos ensaios de ligação de competição aqui descritos é adequado para utilização no procedimento anterior.

Noutro aspecto, o invento proporciona um anticorpo monoclonal anti-NRR de Notch1 que compreende uma ou mais (tal como 2, 3, 4, 5, e/ou 6) HVR do Anticorpo **A**, Anticorpo **A-1**, Anticorpo **A-2**, ou Anticorpo **A-3**. Um anticorpo monoclonal anti-NRR de Notch1 que compreende uma ou mais HVR do Anticorpo **A**, Anticorpo **A-1**, Anticorpo **A-2**, e/ou Anticorpo **A-3** pode ser construído através do enxerto de uma ou mais HVR de Anticorpo **A**, Anticorpo **A-1**, Anticorpo **A-2**, e/ou Anticorpo **A-3** numa sequência molde de anticorpo, p. ex. uma sequência de anticorpo humano que esteja próxima da sequência de murídeo correspondente do anticorpo original, ou uma sequência de consenso de todos os anticorpos humanos no subgrupo particular da cadeia leve ou pesada do anticorpo original, e expressão da ou das sequências quiméricas de região variável da cadeia leve e/ou pesada, com ou sem sequência ou sequências de região constante acompanhantes, em células hospedeiras recombinantes tal como aqui descrito.

Anticorpos anti-NRR de Notch1 do invento possuindo as propriedades únicas aqui descritas podem ser obtidos através de pesquisa de clones de hibridoma anti-NRR de Notch1 quanto às propriedades desejadas através de qualquer método conveniente. Por exemplo, se for desejado um anticorpo monoclonal anti-NRR de Notch1 que bloqueie ou não bloqueie a ligação do ligando de Notch1 a Notch1, o anticorpo candidato pode ser testado num ensaio de ligação de competição, tal como um ELISA de ligação competitiva, em que os poços da placa são revestidos com Notch1, e uma solução de anticorpo num excesso de Notch1 é vertida sobre as placas revestidas, e o anticorpo ligado é detectado por via enzimática, p. ex., colocando em contacto o anticorpo ligado com anticorpo anti-

Ig conjugado com HRP ou anticorpo anti-Ig biotinilado e revelando a reacção de cor de HRP, p. ex., através da revelação das placas com peróxido de estreptavidina-HRP e/ou peróxido de hidrogénio e detecção da reacção de cor de HRP através de espectrofotometria a 490 nm com um leitor de placas de ELISA.

Se for desejado um anticorpo anti-NRR de Notch1 que iniba o crescimento celular, o anticorpo candidato pode ser testado em ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* que medem a inibição do crescimento celular. Tais ensaios são conhecidos na técnica e são ainda aqui descritos e exemplificados.

É também proporcionado um anticorpo alterado que possui algumas mas não todas as funções efectoras, que o tornam um candidato desejado para muitas aplicações em que a semivida do anticorpo *in vivo* seja importante, mesmo que certas funções efectoras (tais como complemento e ADCC) sejam desnecessárias ou deletérias. As actividades de Fc da imunoglobulina produzida são medidas para assegurar que apenas as propriedades desejadas são mantidas. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* e/ou *in vivo* podem ser realizados para confirmar a redução/depleção das actividades de CDC e/ou ADCC. Por exemplo, podem ser realizados ensaios de ligação ao receptor de Fc (FcR), para assegurar que o anticorpo não se liga a FcγR (sendo assim provável que não tenha actividade de ADCC), mas retém a capacidade de ligação a FcRn. As células primárias para mediação de ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, enquanto os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Um exemplo de um ensaio *in vitro* para avaliar a actividade de ADCC de uma molécula de interesse é descrita na Patente US No. 5500362 ou 5821337. Células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células Assassinas Naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a actividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como o descrito em Clynes et al. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998). Ensaios de ligação a C1q podem também ser realizados para confirmar que o anticorpo é incapaz de se ligar a C1q e

por conseguinte não possui actividade de CDC. Para avaliar a activação do complemento, pode ser realizado um ensaio de CDC, p. ex., tal como descrito em Gazzano-Santoro *et al.* *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). A ligação a FcRn e a determinação da eliminação/semivida *in vivo* podem também ser realizadas utilizando métodos conhecidos na técnica, p. ex., os descritos na secção dos Exemplos.

Vectores, Células Hospedeiras e Métodos Recombinantes

Para produção recombinante de um anticorpo do invento, o ácido nucleico codificando-o é isolado e inserido num vector replicável para mais clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. O ADN codificando o anticorpo é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (p. ex., através da utilização de sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesadas e leves do anticorpo). Estão disponíveis muitos vectores. A escolha do vector depende em parte da célula hospedeira a utilizar. Geralmente, as células hospedeiras preferidas são de origem procariótica ou eucariótica (geralmente de mamífero). Será apreciado que possam ser usadas regiões constantes de qualquer isotipo para este fim, incluindo regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que essas regiões constantes possam ser obtidas de qualquer espécie humana ou animal.

a. Geração de anticorpos utilizando células hospedeiras procarióticas:

i. Construção do Vector

As sequências polinucleotídicas codificando componentes polipeptídicos do anticorpo do invento podem ser obtidas utilizando técnicas recombinantes padrão. Sequências polinucleotídicas desejadas podem ser isoladas e sequenciadas a partir de células produtoras de anticorpos, tais como células de hibridoma. Alternativamente, os polinucleótidos podem ser sintetizados utilizando sintetizadores de nucleótidos ou técnicas de PCR. Uma vez obtidas, as sequências codificando os polipéptidos são inseridas num vector recombinante capaz de se replicar e expressar

polinucleótidos heterólogos em hospedeiros procarióticos. Muitos vectores que estão disponíveis e são conhecidos na técnica podem ser utilizados para os fins do presente invento. A selecção de um vector apropriado dependerá principalmente do tamanho dos ácidos nucleicos a inserir no vector e da célula hospedeira particular a transformar com o vector. Cada vector contém vários componentes, dependendo da sua função (amplificação ou expressão do polinucleótido heterólogo, ou ambas) e da sua compatibilidade com a célula hospedeira particular na qual reside. Os componentes do vector incluem geralmente, mas não estão limitados a: uma origem de replicação, um gene marcador de selecção, um promotor, um local de ligação ao ribossoma (RBS), uma sequência sinal, a inserção de ácido nucleico heterólogo e uma sequência de terminação da transcrição.

Em geral, vectores plasmídicos contendo sequências de replicação e de controlo que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira são utilizados em ligação com estes hospedeiros. O vector transporta normalmente um local de replicação, bem como sequências de marcação que são capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, *E. coli* é tipicamente transformada utilizando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli*. pBR322 contém genes codificando resistência a ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tet) e proporciona assim um meio fácil para a identificação de células transformadas. pBR322, seus derivados, ou outros plasmídeos microbianos ou bacteriófagos podem também conter, ou ser modificados para conter, promotores que podem ser utilizados pelo organismo microbiano para expressão de proteínas endógenas. Exemplos de derivados de pBR322 utilizados para expressão de anticorpos particulares são descritos em detalhe em Carter et al., Patente U.S. No. 5648237.

Além disso, os vectores fágicos contendo sequências de replicação e de controlo que são compatíveis com o microrganismo hospedeiro podem ser utilizados como vectores de transformação em ligação com estes hospedeiros. Por exemplo, um bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 pode ser utilizado para fazer um vector recombinante que pode ser

utilizado para transformar células hospedeiras susceptíveis, tais como *E. coli* LE392.

O vector de expressão do invento pode compreender dois ou mais pares promotor-cistrão, codificando cada um dos componentes do polipéptido. Um promotor é uma sequência reguladora não traduzida localizada a montante (5') de um cistrão que modula a sua expressão. Os promotores procarióticos recaem tipicamente em duas classes, indutíveis e constitutivos. O promotor indutível é um promotor que inicia níveis aumentados de transcrição do cistrão sob o seu controlo em resposta a mudanças na condição da cultura, p. ex., a presença ou ausência de um nutriente ou uma mudança na temperatura.

Um grande número de promotores reconhecidos por uma variedade de potenciais células hospedeiras é bem conhecido. O promotor seleccionado pode ser operativamente ligado ao ADN cistrão codificando a cadeia leve ou pesada através da remoção do promotor do ADN fonte através da digestão com enzimas de restrição e inserção da sequência promotora isolada no vector do invento. Tanto a sequência do promotor nativo como muitos promotores heterólogos podem ser utilizados para dirigir a amplificação e/ou expressão dos genes alvo. Nalgumas concretizações, são utilizados promotores heterólogos, uma vez que permitem geralmente uma maior transcrição e maiores rendimentos de gene alvo expresso quando comparados com o promotor do polipéptido alvo nativo.

Promotores adequados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem o promotor PhoA, os sistemas promotores de β -galactamase e lactose, um sistema promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos, tais como o promotor *tac* ou *trc*. No entanto, outros promotores que são funcionais em bactérias (tais como outros promotores bacterianos ou fágicos conhecidos) são também adequados. As suas sequências nucleotídicas foram publicadas, permitindo assim a um perito ligá-los operativamente a cistrões codificando as cadeias leves e pesadas alvo (Siebenlist *et al.*, (1980) *Cell* 20: 269) utilizando ligadores ou adaptadores para fornecer quaisquer locais de restrição requeridos.

Num aspecto do invento, cada cistrão dentro do vector recombinante compreende um componente da sequência sinal de secreção que dirige a translocação dos polipéptidos expressos através de uma membrana. Em geral, a sequência sinal pode ser um componente do vector, ou pode ser parte do ADN polipeptídico alvo que é inserido no vector. A sequência sinal seleccionada para o fim deste invento deve ser uma que seja reconhecida e processada (i.e., clivada por uma sinal-peptidase) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não reconheçam nem processem as sequências sinal nativas dos polipéptidos heterólogos, a sequência sinal é substituída por uma sequência sinal procariótica seleccionada, por exemplo, a partir do grupo que consiste nos líderes da fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp, ou enterotoxina II estável ao calor (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA, e MBP. Num aspecto, as sequências sinal utilizadas em ambos os cistrões do sistema de expressão são sequências sinal de STII ou variantes destas.

Noutro aspecto, a produção das imunoglobulinas de acordo com o invento pode ocorrer no citoplasma da célula hospedeira, e, portanto, não requer a presença de sequências sinal de secreção no interior de cada cistrão. A este respeito, as cadeias leves e pesadas de imunoglobulina são expressas, dobradas e montadas para formar imunoglobulinas funcionais dentro no citoplasma. Certas estirpes hospedeiras (p. ex., as estirpes trxB- de *E. coli*) proporcionam condições de citoplasma que são favoráveis para a formação de ligações dissulfureto, permitindo assim a dobragem e montagem correctas das subunidades expressas da proteína. Proba e Pluckthun *Gene*, 159: 203 (1995).

Células hospedeiras procarióticas adequadas para expressão de anticorpos do invento incluem Archaeobacteria e Eubacteria, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos. Exemplos de bactérias úteis incluem *Escherichia* (p. ex., *E. coli*), *Bacilos* (p. ex., *B. subtilis*), *Enterobacteria*, espécies de *Pseudomonas* (p. ex., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* ou *Paracoccus*. Numa concretização, são utilizadas células gram-negativas. Numa concretização, são utilizadas células de *E.*

E. coli como hospedeiros para o invento. Exemplos de estirpes de *E. coli* incluem a estirpe W3110 (Bachmann, "Cellular and Molecular Biology", vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; Depósito ATCC No. 27325) e derivados destas, incluindo a estirpe 33D3 possuindo o genótipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT(Δ nmpc-fepE) degP41 kanR (Pat. U.S. No. 5639635). Outras estirpes e derivados destas, tais como *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31537) e *E. coli* RV308 (ATCC 31608) são também adequadas. Estes exemplos são ilustrativos e não limitativos. Os métodos para a construção de derivados de qualquer uma das bactérias acima mencionadas possuindo genótipos definidos são conhecidos na técnica e descritos em, por exemplo, Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990). É em geral necessário seleccionar as bactérias apropriadas tendo em consideração a replicabilidade do replicão nas células de uma bactéria. Por exemplo, espécies de *E. coli*, *Serratia* ou *Salmonella* podem ser adequadamente utilizadas como hospedeiro quando plasmídeos bem conhecidos tais como pBR322, pBR325, pACYC177 ou pKN410 são utilizados para fornecer o replicão. Tipicamente, a célula hospedeira deve segregar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inibidores de proteases adicionais podem ser desejavelmente incorporados na cultura de células.

ii. Produção de Anticorpos

As células hospedeiras são transformadas com os vectores de expressão descritos acima e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para indução de promotores, selecção de transformantes, ou amplificação dos genes codificando as sequências desejadas.

Transformação significa introdução de ADN no hospedeiro procariótico de modo a que o ADN seja replicável, quer como um elemento extracromossómico ou através de integrante cromossómico. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é feita utilizando técnicas padrão apropriadas para essas células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio é geralmente utilizado para células bacterianas que contêm barreiras de parede celular substanciais. Outro método para transformação emprega

polietilenoglicol/DMSO. Ainda outra técnica utilizada é electroporação.

As células procarióticas utilizadas para produzir os polipéptidos do invento são cultivadas em meios conhecidos na técnica e adequados para cultura das células hospedeiras seleccionadas. Exemplos de meios adequados incluem caldo de Luria (LB) mais os suplementos nutrientes necessários. Nalguns aspectos, o meio contém também um agente de selecção, escolhido com base na construção do vector de expressão, para permitir selectivamente o crescimento de células procarióticas contendo o vector de expressão. Por exemplo, é adicionada ao meio ampicilina para crescimento de células expressando o gene de resistência à ampicilina.

Quaisquer suplementos necessários além de carbono, azoto e fontes de fosfato inorgânico podem também ser incluídos nas concentrações apropriadas introduzidos sozinhos ou como uma mistura com outro suplemento ou meio tal como uma fonte de azoto complexa. Opcionalmente, o meio de cultura pode conter um ou mais agentes redutores seleccionados a partir do grupo que consiste em glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditiotreitól.

As células hospedeiras procarióticas são cultivadas a temperaturas adequadas. Para crescimento de *E. coli*, por exemplo, a temperatura preferida varia de cerca de 20°C até cerca de 39°C, de maior preferência de cerca de 25°C a cerca de 37°C, ainda de preferência a cerca de 30°C. O pH do meio pode ser qualquer pH variando de cerca de 5 a cerca de 9, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Para *E. coli*, o pH é de preferência de cerca de 6,8 a cerca de 7,4, e de maior preferência de cerca de 7,0.

Se for utilizado um promotor indutível no vector de expressão do invento, a expressão proteica é induzida sob condições adequadas para a activação do promotor. Num aspecto, são utilizados promotores PhoA para controlo da transcrição dos polipéptidos. Deste modo, as células hospedeiras transformadas são cultivadas num meio de fosfato limitante para indução. De preferência, o meio de fosfato limitante é o meio C.R.A.P (ver, p. ex., Simmons et al., J.

Immunol. Methods (2002), 263: 133-147). Uma variedade de outros indutores pode ser utilizada, de acordo com a construção do vector empregue, tal como é conhecido na técnica.

Num aspecto, os polipéptidos expressos do presente invento são segregados para, e recuperados a partir do periplasma das células hospedeiras. A recuperação de proteína envolve tipicamente o rompimento do microrganismo, geralmente por meios tais como choque osmótico, ultra-sons ou lise. Uma vez as células rompidas, os restos celulares ou as células completas podem ser removidas através de centrifugação ou filtração. As proteínas podem ainda ser purificadas, por exemplo, através de cromatografia em resina de afinidade. Alternativamente, as proteínas podem ser transportadas para o meio de cultura e isoladas aí. As células podem ser removidas da cultura e o sobrenadante da cultura filtrado e concentrado para mais purificação das proteínas produzidas. Os polipéptidos expressos podem ser posteriormente isolados e identificados utilizando métodos vulgarmente conhecidos tais como electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio *Western blot*.

Num aspecto, a produção de anticorpos é conduzida em grande quantidade através de um processo de fermentação. Vários procedimentos de fermentação em fornadas em larga escala estão disponíveis para a produção de proteínas recombinantes. As fermentações em larga escala têm, pelo menos, 1000 litros de capacidade, de preferência cerca de 1000 a 100000 litros de capacidade. Estes fermentadores utilizam impulsores agitadores para distribuir oxigénio e nutrientes, especialmente glicose (a fonte de carbono/energia preferida). A fermentação em pequena escala refere-se em geral a fermentação num fermentador que não tem mais do que cerca de 100 litros de capacidade volumétrica, e pode variar de cerca de 1 litro a cerca de 100 litros.

Num processo de fermentação, a indução de expressão proteica é tipicamente iniciada após as células terem crescido sob condições adequadas até uma densidade desejada, p. ex., uma D0550 de cerca de 180-220, estágio em que as células estão na fase estacionária inicial. Pode ser usada

uma variedade de indutores, de acordo com a construção de vector empregue, tal como é conhecido na técnica e descrito acima. As células podem ser cultivadas durante períodos mais curtos antes da indução. As células são normalmente induzidas durante cerca de 12-50 horas, embora possa ser utilizado um tempo de indução mais longo ou mais curto.

Para melhorar o rendimento e a qualidade da produção dos polipéptidos do invento, podem ser modificadas várias condições de fermentação. Por exemplo, para melhorar a montagem e dobragem correctas dos polipéptidos de anticorpo segregados, vectores adicionais sobre-expressando proteínas acompanhantes, tais como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, e/ou DsbG) ou FkpA (uma peptidilprolil-cis,trans-isomerase com actividade de acompanhante) podem ser utilizados para co-transformar as células hospedeiras procarióticas. Foi demonstrado que as proteínas acompanhantes facilitam a dobragem correcta e a solubilidade de proteínas heterólogas produzidas em células hospedeiras bacterianas. Chen *et al.*, (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente U.S. No. 6083715; Georgiou *et al.*, Patente U.S. No. 6027888; Bothmann e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105; Ramm e Pluckthun, (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17106-17113; Arie *et al.*, (2001) *Mol. Microbiol.* 39: 199-210.

Para minimizar a proteólise de proteínas heterólogas expressas (especialmente as que são proteoliticamente sensíveis), certas estirpes hospedeiras deficientes em enzimas proteolíticas podem ser usadas para o presente invento. Por exemplo, as estirpes de células hospedeiras podem ser modificadas para efectuar uma ou mais mutações genéticas nos genes codificando proteases bacterianas conhecidas tais como Protease III, OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI e combinações destas. Algumas estirpes de *E. coli* deficientes em proteases estão disponíveis e são descritas em, por exemplo, Joly *et al.*, (1998), *supra*; Georgiou *et al.*, Patente U.S. No. 5264365; Georgiou *et al.*, Patente U.S. No. 5508192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996).

Num aspecto, estirpes de *E. coli* deficientes em enzimas proteolíticas e transformadas com plasmídeos sobre-expressando uma ou mais proteínas acompanhantes são utilizadas como células hospedeiras no sistema de expressão do invento.

iii. Purificação de Anticorpos

Métodos de purificação de proteínas padrão conhecidos na técnica podem ser empregues. Os seguintes procedimentos são exemplos de procedimentos de purificação adequados: fraccionamento em colunas de imunoafinidade ou permuta iónica, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica ou numa resina de permuta catiónica tal como DEAE, cromatofocagem, SDS-PAGE, precipitação com sulfato de amónio, e filtração em gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75.

Num aspecto, Proteína A imobilizada numa fase sólida é utilizada para a purificação de imunoafinidade dos produtos de anticorpo inteiros do invento. A proteína A é uma proteína de parede celular de 41kD de *Staphylococcus aureus* que se liga com uma elevada afinidade à região Fc dos anticorpos. Lindmark *et al.*, (1983) *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13. A fase sólida a que a Proteína A é imobilizada é de preferência uma coluna compreendendo uma superfície de vidro ou sílica, de maior preferência uma coluna de vidro de poro controlado ou uma coluna de ácido silícico. Em algumas aplicações, a coluna foi revestida com um reagente, tal como glicerol, numa tentativa de impedir aderência não específica de contaminantes.

Como primeiro passo de purificação, a preparação derivada da cultura celular tal como descrita acima, é aplicada sobre a fase sólida com proteína A imobilizada para permitir a ligação específica do anticorpo de interesse à Proteína A. A fase sólida é então lavada para remover contaminantes ligados não especificamente à fase sólida. Finalmente, o anticorpo de interesse é recuperado a partir da fase sólida através de eluição.

b. Geração de anticorpos utilizando células hospedeiras eucarióticas:

Os componentes do vector incluem geralmente, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: uma sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento estimulador, um promotor, e uma sequência de terminação da transcrição.

(i) Componente sequência sinal

Um vector para utilização numa célula hospedeira eucariótica pode também conter uma sequência sinal ou outro polipéptido possuindo um local de clivagem específico no terminal N da proteína madura ou do polipéptido de interesse. A sequência sinal heteróloga seleccionada é de preferência uma que é reconhecida e processada (i.e., clivada por uma sinal-peptidase) pela célula hospedeira. Na expressão em células de mamífero, sequências sinal de mamífero bem como líderes de secreção virais, por exemplo, o sinal de gD de herpes simplex, estão disponíveis.

O ADN para tal região precursora é ligado em enquadramento de leitura ao ADN codificando o anticorpo.

(ii) Origem de replicação

Geralmente, não é necessário um componente origem de replicação para vectores de expressão em mamífero. Por exemplo, a origem de SV40 pode ser tipicamente utilizada apenas porque contém o promotor inicial.

(iii) Componente gene de selecção

Os vectores de expressão e clonagem podem conter um gene de selecção, também denominado um marcador seleccionável. Os genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, p. ex., ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, quando relevantes, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos.

Um exemplo de um esquema de selecção utiliza um fármaco para parar o crescimento de uma célula hospedeira. As células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência a um fármaco e sobrevivem assim ao regime de selecção. Exemplos de tal selecção dominante utilizam os fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero são os que permitem a identificação de células competentes para tomar o ácido nucleico do anticorpo, tais como DHFR, timidina-cinase, metalotioneína-I e II, de preferência genes de metalotioneína de primatas, adenosina-desaminase, ornitina-descarboxilase, etc.

Por exemplo, as células transformadas com o gene de selecção de DHFR são primeiro identificadas através de cultura de todos os transformantes num meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando é empregue DHFR de tipo selvagem é a linha celular de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente em actividade de DHFR (p.ex., ATCC CRL-9096).

Alternativamente, células hospedeiras (particularmente hospedeiras de tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequências de ADN codificando um anticorpo, proteína DHFR de tipo selvagem, e outro marcador seleccionável, tal como aminoglicósido-3'-fosfotransferase (APH) podem ser seleccionadas através de crescimento celular em meio contendo um agente de selecção para o marcador seleccionável tal como um antibiótico aminoglicosídico, p. ex., canamicina, neomicina, ou G418. Ver Patente U.S. No. 4965199.

(iv) Componente promotor

Os vectores de expressão e clonagem contêm usualmente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operativamente ligado ao ácido nucleico do polipéptido do anticorpo. São conhecidas sequências promotoras para

eucariotas. Virtualmente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do local onde a transcrição é iniciada. Outra sequência verificada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda poli A à extremidade 3' da sequência de codificação. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vectores de expressão eucarióticos.

A transcrição do polipéptido do anticorpo a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, através de promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como vírus de políoma, vírus da varíola das aves, adenovírus (tais como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus de sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus Símio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, p. ex., o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

Os promotores inicial e tardio do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição de SV40 que também contém a origem de replicação viral de SV40. O promotor inicial imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição HindIII E. Um sistema para expressar ADN em hospedeiros mamíferos utilizando o vírus do papiloma bovino como vector é divulgado na Patente U.S. No. 4419446. Uma modificação deste sistema é descrita na Patente U.S. No. 4601978. Alternativamente, a repetição terminal longa do Vírus de Sarcoma de Rous pode ser utilizada como promotor.

(v) Componente elemento estimulador

A transcrição do ADN codificando o polipéptido de anticorpo deste invento por eucariotas superiores é frequentemente aumentada através da inserção de uma sequência estimuladora no vector. Muitas sequências estimuladoras são

agora conhecidas de genes de mamífero (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente, no entanto, utilizar-se-á um estimulador de um vírus de células eucarióticas. Exemplos incluem o estimulador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o estimulador do promotor inicial de citomegalovírus, o estimulador de políoma no lado tardio da origem de replicação, e estimuladores de adenovírus. Ver também Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos de estimulação para activação de promotores eucarióticos. O estimulador pode ser inserido no vector numa posição 5' ou 3' em relação à sequência codificando o polipéptido do anticorpo, mas localiza-se de preferência num local a 5' do promotor.

(vi) Componente terminação da transcrição

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas conterão tipicamente também sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do ARNm. Tais sequências estão vulgarmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas a 5' e, ocasionalmente 3', dos ADN ou ADNc eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm codificando um anticorpo. Um componente terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona de crescimento bovina. Ver WO94/11026 e o vector de expressão aí divulgado.

(vii) Selecção e transformação de células hospedeiras

Células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ADN nos vectores aqui incluem as células de eucariotas superiores aqui descritas, incluindo células hospedeiras de vertebrado. A propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhas celulares hospedeiras de mamífero úteis são a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embrionário humano (293 ou células 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59 (1977)); células de rim de hamster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de

ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals NY Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2).

As células hospedeiras são transformadas com os vectores de expressão ou clonagem acima descritos para produção de anticorpos e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para indução de promotores, selecção de transformantes, ou amplificação dos genes codificando as sequências desejadas.

(viii) *Cultura das células hospedeiras*

As células hospedeiras utilizadas para produzir um anticorpo deste invento podem ser cultivadas numa variedade de meios. Meios disponíveis comercialmente, tais como de Ham F10 (Sigma), Meio Essencial Mínimo (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para cultura das células hospedeiras. Além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes *et al.* *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Pat. U.S. Nos. 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; ou 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; ou Patente U.S. Re. 30985 pode ser utilizado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormonas e/ou outros factores de crescimento (tais como insulina, transferrina, ou factor de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleótidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como o fármaco GENTAMYCIN™), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos normalmente

presentes em concentrações finais no intervalo micromolar) e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que serão conhecidas dos peritos na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são as previamente utilizadas com a célula hospedeira seleccionada para expressão e serão evidentes para o vulgar perito na técnica.

(ix) *Purificação do anticorpo*

Ao utilizar técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, ou segregado directamente para o meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como primeiro passo, os restos particulados, sejam células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, através de centrifugação ou ultrafiltração. Quando o anticorpo é segregado para o meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente primeiro concentrados utilizando um filtro de concentração de proteínas comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de proteases tal como PMSF pode ser incluído em qualquer um dos passos anteriores para inibir proteólise e podem ser incluídos antibióticos para prevenir o crescimento de contaminantes adventícios.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada utilizando, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade a técnica de purificação preferida. A adequação da proteína A como ligando de afinidade depende da espécie e do isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que esteja presente no anticorpo. A proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que sejam baseados em cadeias pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, ou $\gamma 4$ (Lindmark et al. *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de ratinho e para $\gamma 3$ humana (Guss et al. *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligando de afinidade é ligado é muito frequentemente agarose, mas estão disponíveis outras matrizes. Matrizes mecanicamente estáveis tais como

vidro de poro controlado ou poli(estireno-divinil)benzeno permitem caudais mais rápidos e tempos de processamento mais curtos dos que os que podem ser alcançados com agarose. Quando o anticorpo compreende um domínio CH3, a resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteínas tais como fraccionamento numa coluna de permuta iónica, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina-SEPHAROSE™ numa resina de permuta aniónica ou catiónica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE, e precipitação com sulfato de amónio estão também disponíveis dependendo do anticorpo a recuperar.

Após qualquer ou quaisquer passos de purificação preliminares, a mistura compreendendo o anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida a cromatografia de interacção hidrófoba de pH baixo utilizando um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,5-4,5, de preferência realizada a baixas concentrações salinas (p. ex., de cerca de 0-0,25 M de sal).

Imunoconjugados

São também proporcionados imunoconjugados (alternadamente denominados "conjugados anticorpo-fármaco" ou "ADC"), que compreendem qualquer um dos anticorpos anti-NRR de Notch1 aqui descritos conjugados com um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, um fármaco, um agente inibidor do crescimento, uma toxina (p. ex., uma toxina enzimaticamente activa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destas), ou um isótopo radioactivo (i. e., um radioconjugado).

A utilização de conjugados anticorpo-fármaco para a distribuição local de agentes citotóxicos ou citostáticos, i.e., fármacos para matar ou inibir células tumorais no tratamento de cancro (Syrigos e Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz e Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172; Patente U.S. No. 4975278) permite a distribuição direccionada da porção fármaco a tumores, e a acumulação intracelular aí, onde a administração sistémica

destes agentes farmacológicos não conjugados pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicidade para células normais bem como as células tumorais que se procura eliminar (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Março 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Transporters Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em "Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications", A. Pinchera et al. (ed.s), págs. 475-506). Procura-se assim máxima eficácia com mínima toxicidade. Tanto os anticorpos policlonais como monoclonais têm sido relatados como úteis para estas estratégias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Os fármacos utilizados nestes métodos incluem daunomicina, doxorubicina, metotrexato e vindesina (Rowland et al., (1986) *supra*). As toxinas utilizadas em conjugados anticorpo-toxina incluem toxinas bacterianas tais como a toxina da difteria, toxinas vegetais tais como rícino, toxinas de molécula pequena tais como geldanamicina (Mandler et al., (2000) *Jour. do Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler et al., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler et al., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), maitansinóides (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623), e caliqueamicina (Lode et al., (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman et al., (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). As toxinas podem exercer os seus efeitos citotóxicos e citostáticos através de mecanismos incluindo ligação a tubulina, ligação a ADN, ou inibição da topoisomerase. Alguns fármacos citotóxicos tendem a ser inactivos ou menos activos quando conjugados com grandes anticorpos ou ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idex) é um conjugado anticorpo-radioisótopo composto por um anticorpo monoclonal IgG I capa de murídeo dirigido contra o antígeno CD20 verificado na superfície de linfócitos B normais e malignos e o radioisótopo ^{111}In ou ^{90}Y ligado através de um ligador-quelante de tioureia (Wiseman et al., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7): 766-77; Wiseman et al., (2002) *Blood* 99(12): 4336-42; Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10): 2453-63; Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15): 3262-69). Embora ZEVALIN tenha actividade contra Linfoma de células B não-Hodgkin (NHL), a administração resulta em citopenias graves e prolongadas na maioria dos

pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), um conjugado anticorpo-fármaco composto por um anticorpo hu CD33 ligado a caliqueamicina, foi aprovado em 2000 para o tratamento de leucemia mielóide aguda através de injeção (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patente US Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), um conjugado anticorpo-fármaco composto pelo anticorpo huC242 ligado através do ligador dissulfureto SPP à porção do fármaco maitansinóide, DM1, está a avançar para ensaios de Fase II para o tratamento de cancros que expressam CanAg, tais como do cólon, pancreático, gástrico, e outros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), um conjugado anticorpo-fármaco composto pelo anticorpo monoclonal anti-antigénio de membrana específico da próstata (PSMA) ligado à porção fármaco maitansinóide, DM1, está em desenvolvimento para o potencial tratamento de tumores da próstata. Os péptidos auristatina, auristatina E (AE) e monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos da dolastatina, foram conjugados com anticorpos monoclonais quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y em carcinomas) e cAC10 (específicos para CD30 em malignidades hematológicas) (Doronina et al., (2003) *Nature Biotechnology*, 21(7): 778-784) e estão em desenvolvimento terapêutico.

São aqui descritos agentes quimioterapêuticos úteis na geração de imunoconjugados (p. ex., acima). Toxinas enzimaticamente activas e fragmentos destas que podem ser utilizados incluem a cadeia A da difteria, fragmentos activos que não se ligam à toxina da difteria, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A do rícino, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, e os tricotecenos. Ver, p. ex., WO 93/21232 publicado a 28 de Outubro de 1993. Uma variedade de radionuclídeos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, e ¹⁸⁶Re. Os conjugados de anticorpo e agente citotóxico são produzidos utilizando uma variedade de agentes de ligação de

proteínas bifuncionais tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como dimetil-adipimidato-HCl), ésteres activos (tais como dissuccinimidil-suberato), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, pode ser preparada uma imunotoxina de rícino tal como descrito em Vitetta *et al.* *Science*, 238: 1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno-triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado com carbono-14 é um exemplo de agente quelante para conjugação do radionucleótido com o anticorpo. Ver WO94/11026.

Os conjugados de um anticorpo e uma ou mais toxinas de molécula pequena, tais como caliqueamicina, maitansinóides, dolastatinas, aurostatinas, um tricoteceno, e CC1065, e os derivados destas toxinas que têm actividade de toxina, estão também aqui contemplados.

i. Maitansina e maitansinóides

Nalguns aspectos, o imunoconjugado compreende um anticorpo (inteiro ou fragmentos) do invento conjugado com uma ou mais moléculas de maitansinóide.

Os maitansinóides são inibidores mitóticos que actuam através da inibição da polimerização da tubulina. Maitansina foi isolada pela primeira vez a partir do arbusto da África oriental *Maytenus serrata* (Patente U.S. No. 3896111). Subsequentemente, foi descoberto que certos micróbios também produzem maitansinóides, tais como maitansinol e ésteres de maitansinol C-3 (Patente U.S. No. 4151042). O maitansinol sintético e derivados e análogos destes são divulgados, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 4137230, 4248870, 4256746, 4260608, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4313946, 4315929, 4317821, 4322348, 4331598, 4361650, 4364866, 4424219, 4450254, 4362663, e 4371533.

As porções do fármaco maitansinóide são porções de fármaco atractivas em conjugados anticorpo-fármaco porque são: (i) relativamente acessíveis de preparar através de fermentação ou modificação química, derivatização dos produtos de fermentação, (ii) susceptíveis de derivação com grupos funcionais adequados para conjugação através de ligadores não dissulfureto com anticorpos, (iii) estáveis no plasma, e (iv) eficazes contra uma variedade de linhas celulares tumorais.

Imunoconjugados contendo maitansinóides, métodos de os produzir, e sua utilização terapêutica são divulgados, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5208020, 5416064 e Patente Europeia EP 0425235B1, cujas divulgações são aqui expressamente incorporadas por referência. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996) descreveram imunoconjugados compreendendo um maitansinóide designado DM1 ligado ao anticorpo monoclonal C242 dirigido contra cancro colorrectal humano. Verificou-se que o conjugado era altamente citotóxico contra células do cancro do cólon em cultura, e mostrava actividade anti-tumoral num ensaio de crescimento de tumores *in vivo*. Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992) descrevem imunoconjugados em que um maitansinóide foi conjugado através de um ligador dissulfureto ao anticorpo de murídeo A7 que se liga a um antigénio em linhas celulares de cancro do cólon humano, ou a outro anticorpo monoclonal TA.1 de murídeo que se liga ao oncogene HER-2/neu. A citotoxicidade do conjugado TA.1-maitansinóide foi testada *in vitro* na linha de células de cancro da mama humano SK-BR-3, que expressa 3×10^5 antigénios da superfície HER-2 por célula. O conjugado de fármaco atingiu um grau de citotoxicidade semelhante ao fármaco maitansinóide livre, o qual podia ser aumentado através do aumento do número de moléculas de maitansinol por molécula de anticorpo. O conjugado A7-maitansinóide mostrou baixa citotoxicidade sistémica em ratinhos.

Os conjugados anticorpo-maitansinóide são preparados através da ligação química de um anticorpo a uma molécula de maitansinóide, sem diminuir significativamente a actividade biológica, quer do anticorpo quer da molécula de maitansinóide. Ver, p. ex., Patente U.S. No. 5208020 (a

divulgação da qual é aqui expressamente incorporada por referência). Uma média 3-4 de moléculas de maitansinóide conjugadas por molécula de anticorpo demonstrou eficácia no aumento da citotoxicidade das células alvo sem afectar negativamente a função ou solubilidade do anticorpo, embora fosse de esperar que mesmo uma molécula de toxina/anticorpo aumentaria a citotoxicidade em relação à utilização de anticorpo nu. Os maitansinóides são bem conhecidos na técnica e podem ser sintetizados através de técnicas conhecidas ou isolados a partir de fontes naturais. Maitansinóides adequados são divulgados, por exemplo, na Patente U.S. No. 5208020 e nas outras patentes e publicações sem serem patentes aqui referidas acima. Os maitansinóides preferidos são maitansinol e análogos de maitansinol modificados no anel aromático ou noutras posições da molécula de maitansinol, tais como vários ésteres de maitansinol.

Existem muitos grupos de ligação conhecidos na técnica para produzir conjugados anticorpo-maitansinóide, incluindo, por exemplo, os divulgados na Patente U.S. No. 5208020 ou Patente EP 0425235 B1, Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992), e Pedido de Patente U.S. No. 10/960602, apresentado a 8 de Outubro de 2004. Os conjugados anticorpo-maitansinóide compreendendo o componente ligador SMCC podem ser preparados tal como descrito no Pedido de Patente U.S. No. 10/960602, apresentado a 8 de Outubro de 2004. Grupos de ligação incluem grupos dissulfureto, grupos tioéter, grupos lábeis em ácido, grupos fotolábeis, grupos lábeis às peptidases ou grupos lábeis às esterases, tal como divulgado nas patentes identificadas acima, sendo preferidos grupos dissulfureto e tioéter. Grupos de ligação adicionais são aqui descritos e exemplificados.

Os conjugados do anticorpo e maitansinóide podem ser produzidos utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como dimetil-adipimidato-HCl), ésteres activos (tais como disuccinimidil-suberato), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-

azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Agentes de acoplamento particularmente preferidos incluem N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al. Biochem. J.* 173: 723-737 (1978)) e N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar uma ligação dissulfureto.

O ligador pode ser ligado à molécula maitansinóide em várias posições, dependendo do tipo do ligador. Por exemplo, uma ligação éster pode ser formada através de reacção com um grupo hidroxilo, utilizando técnicas de acoplamento convencionais. A reacção pode ocorrer na posição C-3 possuindo um grupo hidroxilo, na posição C-14 modificada com hidroximetilo, na posição C-15 modificada com um grupo hidroxilo, e na posição C-20 possuindo um grupo hidroxilo. Numa concretização preferida, a ligação é formada na posição C-3 de maitansinol ou de um análogo de maitansinol.

ii. Auristatinas e dolastatinas

Nalguns aspectos, o imunoconjugado compreende um anticorpo do invento conjugado com dolastatinas ou análogos e derivados peptídicos de dolastatinas, as auristatinas (Patentes U.S. Nos. 5635483 e 5780588). Mostrou-se que as dolastatinas e auristatinas interferem com a dinâmica dos microtúbulos, a hidrólise de GTP, e a divisão nuclear e celular (Woyke *et al.*, (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) e têm actividade anticancro (Patente U.S. No. 5663149) e actividade antifúngica (Pettit *et al.*, (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2961-2965). A porção fármaco de dolastatina ou auristatina pode ser ligada ao anticorpo através do terminal N (amino) ou do terminal C (carboxilo) da porção fármaco peptídica (WO 02/088172).

Concretizações de auristatina exemplares incluem as porções fármaco monometilauristatina ligadas ao terminal N DE e DF, divulgadas em "Monomethylvaline Compounds Capable of

Conjugation to Ligands", Ser. U.S. No. 10/983340, apresentada a 5 de Novembro de 2004.

Tipicamente, porções fármaco baseadas em péptidos podem ser preparadas através da formação de uma ligação peptídica entre dois ou mais aminoácidos e/ou fragmentos peptídicos. Tais ligações peptídicas podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com o método de síntese em fase líquida (ver E. Schröder e K. Lübke, "The Peptides", volume 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que é bem conhecido no campo da química de péptidos. As porções fármaco auristatina/dolastatina podem ser preparadas de acordo com os métodos de: Patentes U.S. Nos. 5635483 e 5780588; Pettit et al., (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 11: 5463-5465; Pettit et al., (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243-277; Pettit, G.R., et al., *Synthesis*, 1996, 719-725; e Pettit et al., (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 5: 859-863. Ver também Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Ser. US No. 10/983340, apresentada a 5 de Novembro de 2004, aqui incorporada por referência na sua totalidade (divulgando, p. ex., ligadores e métodos de preparação de compostos monometilvalina, tais como MMAE e MMAF conjugados com ligadores).

iii. Caliqueamicina

Noutros aspectos, o imunoconjugado compreende um anticorpo do invento conjugado com uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família de antibióticos caliqueamicina é capaz de produzir quebras de ADN de cadeia dupla em concentrações sub-picomolares. Para a preparação dos conjugados da família das caliqueamicinas, ver Patentes U.S. Nos. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 e 5877296 (todas para American Cyanamid Company). Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitados a, γ_1^1 , $\alpha_2^1 \alpha_3^1$, N-acetil- γ_1^1 , PSAG e θ_1^1 (Hinman et al., *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) e as patentes U.S. acima mencionadas para American Cyanamid). Outro fármaco anti-tumoral a que o anticorpo pode ser conjugado é QFA que é um antifolato. Tanto a caliqueamicina como o QFA têm locais de acção intracelulares

e não atravessam facilmente a membrana plasmática. Portanto, a tomada celular destes agentes através de internalização mediada por anticorpos aumenta grandemente os seus efeitos citotóxicos.

iv. Outros agentes citotóxicos

Outros agentes anti-tumorais que podem ser conjugados com os anticorpos do invento incluem BCNU, estreptozaicina, vincristina e 5-fluorouracilo, a família de agentes conhecida colectivamente como complexo LL-E33288 descrita nas Patentes U.S. Nos. 5053394 e 5770710, bem como esperamicinas (Patente U.S. No. 5877296).

Toxinas enzimaticamente activas e fragmentos destas que podem ser utilizados incluem a cadeia A da difteria, fragmentos activos que não se ligam da toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia de A de rícino, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Ver, por exemplo, WO 93/21232 publicado a 28 de Outubro de 1993.

É também proporcionado um imunoconjugado formado entre um anticorpo e um composto com actividade nucleolítica (p. ex., uma ribonuclease ou uma ADN-endonuclease tal como uma desoxirribonuclease; ADNase).

Para a destruição selectiva do tumor, o anticorpo pode compreender um átomo altamente radioactivo. Está disponível uma variedade de isótopos radioactivos para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu. Quando o conjugado é utilizado para detecção, pode compreender um átomo radioactivo para estudos cintigráficos, por exemplo tc^{99m} ou I¹²³, ou um marcador de spin para imagiologia de ressonância magnética nuclear (RMN) (também conhecida como imagiologia de ressonância magnética, mri), tais como iodo-123 novamente, iodo-131, índio-111, flúor-19,

carbono-13, azoto-15, oxigénio-17, gadolínio, manganês ou ferro.

Os marcadores radioactivos ou outros podem ser incorporados no conjugado de modos conhecidos. Por exemplo, o péptido pode ser biossintetizado ou pode ser sintetizado através de síntese química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adequados envolvendo, por exemplo, flúor-19 em vez de hidrogénio. Marcadores tais como $\text{tc}^{99\text{m}}$ ou I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} podem ser ligados através de um resíduo de cisteína no péptido. O ítrio-90 pode ser ligado através de um resíduo de lisina. O método IODOGEN (Fraker et al., (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) pode ser utilizado para incorporar iodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) descrevem outros métodos em detalhe.

Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico podem ser produzidos utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como dimetil-adipimidato-HCl), ésteres activos (tais como disuccinimidilo-suberato), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de rícino pode ser preparada como descrito em Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno-triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado com carbono-14 é um exemplo de agente quelante para conjugação do radionucleótido com o anticorpo. Ver WO94/11026. O ligador pode ser um "ligador clivável" facilitando a libertação do fármaco citotóxico na célula. Por exemplo, pode ser utilizado um ligador lábil a ácidos, ligador sensível a peptidases, ligador fotolábil, ligador dimetilo ou ligador contendo dissulfureto (Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992); Patente U.S. No. 5208020).

Os compostos contemplam expressamente, mas não estão limitados a, ADC preparado com reagentes de reticulação: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, e sulfo-SMPB, e SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfono)benzoato) que estão comercialmente disponíveis (p. ex., em Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Ver páginas 467-498, 2003-2004 "Applications Handbook and Catalog".

v. Preparação de conjugados anticorpo-fármaco

Nos conjugados anticorpo-fármaco (ADC), um anticorpo (Ab) é conjugado com uma ou mais porções fármaco (D), p. ex. cerca de 1 a cerca de 20 porções fármaco por anticorpo, através de um ligador (L). ADC de Fórmula I pode ser preparado através de várias vias, empregando reacções de química orgânica, condições e reagentes conhecidos dos peritos na técnica, incluindo: (1) reacção de um grupo nucleófilo de um anticorpo com um reagente ligador bivalente, para formar Ab-L, através de uma ligação covalente, seguido de reacção com uma porção fármaco D; e (2) reacção de um grupo nucleófilo de uma porção fármaco com um reagente ligador bivalente, para formar D-L, através de uma ligação covalente, seguido de reacção com o grupo nucleófilo de um anticorpo. Métodos adicionais de preparar ADC são aqui descritos.



O ligador pode ser composto por um ou mais componentes ligadores. Componentes ligadores exemplares incluem 6-maleimidocaproil ("MC"), maleimidopropanoil ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenziloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato ("SPP"), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato ("SMCC"), e N-succinimidil-(4-iodo-acetil)aminobenzoato ("SIAB"). Componentes ligadores adicionais são conhecidos na técnica e alguns são aqui descritos. Ver também "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Ser. U.S. No.

10/983340, apresentado a 5 de Novembro de 2004, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

O ligador pode compreender resíduos de aminoácidos. Componentes ligadores de aminoácidos exemplares incluem um dipéptido, um tripéptido, um tetrapéptido ou um pentapéptido. Dipéptidos exemplares incluem: valina-citrulina (vc ou val-cit), alanina-fenilalanina (af ou ala-phe). Exemplos de tripéptidos incluem: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) e glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Resíduos de aminoácidos que constituem um componente ligador de aminoácidos incluem os de ocorrência natural, bem como aminoácidos menores e análogos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente, tais como citrulina. Componentes ligadores de aminoácidos podem ser concebidos e otimizados na sua selectividade para clivagem enzimática por enzimas particulares, por exemplo, uma protease associada a tumor, catepsina B, C e D ou uma protease de plasmina.

Grupos nucleófilos em anticorpos incluem, mas não estão limitados a: (i) grupos amina N-terminais, (ii) grupos amina de cadeia lateral, p. ex., lisina, (iii) grupos tiol de cadeia lateral, p. ex., cisteína, e (iv) grupos hidroxilo ou amino de açúcar onde o anticorpo é glicosilado. Os grupos amina, tiol, e hidroxilo são nucleófilos e capazes de reagir de modo a formar ligações covalentes com grupos electrófilos em porções ligadoras e reagentes ligadores incluindo: (i) ésteres activos tais como ésteres de NHS, ésteres de HOBT, haloformatos e halogenetos de ácido; (ii) halogenetos de alquilo e benzilo tais como haloacetamidas; (iii) grupos aldeídos, cetonas, carboxilo e maleimida. Certos anticorpos têm dissulfuretos intercadeias redutíveis, i.e., pontes de cisteína. Os anticorpos podem ser tornados reactivos para conjugação com reagentes ligadores através de tratamento com um agente redutor tal como DTT (ditiotreitól). Cada ponte de cisteína, formará, assim, teoricamente, dois grupos nucleófilos tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionais podem ser introduzidos em anticorpos através da reacção de lisinas com 2-iminotiolano (reagente de Traut) resultando na conversão de uma amina num tiol. Os grupos tiol reactivos podem ser introduzidos no anticorpo (ou fragmento deste) através da introdução de um, dois, três, quatro, ou mais

resíduos de cisteína (p. ex., a preparação de anticorpos mutantes compreendendo um ou mais resíduos do aminoácido cisteína não nativos).

Os conjugados anticorpo-fármaco podem também ser produzidos através de modificação do anticorpo para introduzir porções electrófilas, que podem reagir com substituintes nucleófilos no reagente ligador ou fármaco. Os açúcares de anticorpos glicosilados podem ser oxidados, p. ex., com reagentes oxidantes de periodato, para formar grupos aldeído ou cetona que podem reagir com o grupo amina de reagentes ligadores ou porções fármaco. Os grupos imina base de Schiff resultantes podem formar uma ligação estável, ou podem ser reduzidos, p. ex., através de reagentes boroidreto para formar ligações de amina estáveis. A reacção da porção hidrato de carbono de um anticorpo glicosilado com galactose-oxidase ou meta-periodato de sódio pode produzir grupos carbonilo (aldeído e cetona) na proteína, que podem reagir com grupos adequados no fármaco (Hermanson, "Bioconjugate Techniques"). As proteínas contendo resíduos serina ou treonina N-terminais podem reagir com meta-periodato de sódio, resultando na produção de um aldeído no lugar do primeiro aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146; Patente U.S. No. 5362852). Esse aldeído pode ser feito reagir com uma molécula de fármaco ou nucleófilo ligador.

Da mesma forma, grupos nucleófilos numa porção fármaco incluem, mas não estão limitados a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina e aril-hidrazida capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupo electrófilos em porções ligadoras e reagentes ligadores incluindo: (i) ésteres activos tais como ésteres de NHS, ésteres de HOBT, haloformatos, e halogenetos ácidos; (ii) halogenetos de alquilo e benzilo tais como haloacetamidas; (iii) grupos aldeídos, cetonas, carboxilo e maleimida.

Alternativamente, pode ser produzida uma proteína de fusão compreendendo o anticorpo e agente citotóxico, p. ex., através de técnicas recombinantes ou síntese peptídica. A extensão do ADN pode compreender as respectivas regiões

codificando as duas porções do conjugado, quer adjacentes uma à outra quer separadas por uma região codificando um péptido ligador que não destrói as propriedades desejadas do conjugado.

Ainda noutro aspecto o anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização em pré-direccionamento para o tumor em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao indivíduo, seguido por remoção do conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de eliminação e depois administração de um "ligando" (p. ex., avidina) que é conjugado com um agente citotóxico (p. ex., um radionucleótido).

Formulações Farmacêuticas

As formulações terapêuticas compreendendo um anticorpo do invento são preparadas para armazenamento através da mistura do anticorpo possuindo o grau de pureza desejado com transportadores, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis opcionais, (Remington: "The Science and Practice of Pharmacy" 20^a edição (2000)), na forma de soluções aquosas, formulações secas liofilizadas ou outras. Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, histidina e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio; cloreto de benzetónio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (inferior a cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (p.

ex., complexos Zn-proteína); e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

A formulação aqui pode também conter mais do que um composto activo conforme necessário para a indicação particular a tratar, de preferência aqueles com actividades complementares que não se afectam adversamente uns aos outros. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida.

Os ingredientes activos podem também ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou através de polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas coloidais de distribuição de fármacos (p. ex., lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são reveladas em Remington: "The Science and Practice of Pharmacy" 20ª edição (2000).

As formulações a utilizar para administração *in vivo* têm de ser estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Podem ser preparadas preparações de libertação sustida. Exemplos adequados de preparações de libertação sustida incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo a imunoglobulina do invento, matrizes essas que estão na forma de artigos moldados, p. ex., películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação sustida incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), poliláctidos (Patente U.S. No. 3773919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo não degradáveis, de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injectáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolide), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Enquanto polímeros tais como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem a

libertação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando as imunoglobulinas encapsuladas permanecem no corpo durante um longo tempo, podem desnaturar ou agregar-se em resultado da exposição à humidade a 37°C, resultando numa perda de actividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser concebidas para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação descoberto for a formação de uma ligação S-S intermolecular através de intercâmbio tio-dissulfureto, a estabilização pode ser conseguida através da modificação de resíduos sulfidrilo, liofilização a partir de soluções ácidas, controlo do teor de humidade, utilização de aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições de matrizes poliméricas específicas.

Utilizações

Um anticorpo do presente invento pode ser utilizado em métodos terapêuticos, por exemplo, *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*.

São também proporcionados métodos para o tratamento ou a prevenção de um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular associado a maior expressão e/ou actividade (sinalização) de Notch1, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento.

Noutro aspecto, o invento proporciona métodos para redução, inibição, ou prevenção do crescimento de um tumor ou cancro, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento.

Além disso, pelo menos alguns dos anticorpos do invento podem ligar-se a antigénios de outras espécies. Desejavelmente, um anticorpo de NRR de Notch1 liga-se tanto à NRR de Notch1 humana como de ratinho; desejavelmente com uma Kd de 1×10^{-7} ou mais forte. Deste modo, os anticorpos do

invento podem ser utilizados para se ligarem especificamente a uma actividade de antigénio específica, p. ex., numa cultura de células contendo o antigénio, em indivíduos humanos ou noutros sujeitos mamíferos possuindo o antigénio com o qual um anticorpo do presente invento reaja de forma cruzada (p. ex., chimpanzé, babuíno, saguim, cinomolgo e rhesus, porco ou ratinho). Numa concretização, o anticorpo do invento pode ser utilizado para inibição de actividades de antigénio através do contacto do anticorpo com o antigénio de modo a que a actividade do antigénio seja inibida. De preferência, o antigénio é uma molécula proteica humana.

Um anticorpo do invento pode ser utilizado num método para ligação a um antigénio num indivíduo sofrendo de um distúrbio associado a maior expressão e/ou actividade (sinalização) do antigénio, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo do invento, de modo a que se ligue ao antigénio no indivíduo. Entenda-se que o aumento da actividade de Notch1 (sinalização) engloba o aumento da actividade Notch1 devido a mutações de activação de Notch, aumento da actividade de Notch1 devido ao aumento da expressão e/ou actividade de ligandos de Notch, bem como aumento da actividade de Notch1 devido a outros mecanismos. De preferência, o antigénio é uma molécula proteica humana e o indivíduo é um ser humano. Alternativamente, o indivíduo pode ser um mamífero expressando o antigénio ao qual um anticorpo do invento se liga. Ainda, o indivíduo pode ser um mamífero no qual o antigénio foi introduzido (p. ex., através de administração do antigénio, ou através de expressão de um transgene do antigénio). Um anticorpo do invento pode ser administrado a um indivíduo humano para fins terapêuticos. Além disso, um anticorpo do invento pode ser administrado a um mamífero não humano expressando um antigénio com o qual a imunoglobulina reage de forma cruzada (p. ex., um primata, porco, ou ratinho) para fins veterinários ou como modelo animal de doença humana. Relativamente a este último, tais modelos animais podem ser úteis para avaliar a eficácia terapêutica dos anticorpos do invento (p. ex., testes de dosagem e tempos de administração).

Os anticorpos do invento podem ser utilizados para tratar, inibir, atrasar a progressão de, prevenir e/ou

retardar a recorrência de, melhorar ou prevenir doenças, distúrbios ou condições associados a expressão e/ou actividade de uma ou mais moléculas de antigénio.

Exemplos de distúrbios incluem carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia ou malignidades linfóides. Exemplos mais particulares de tais cancros incluem cancro de células escamosas (p. ex., cancro de células epiteliais escamosas), cancro do pulmão incluindo cancro do pulmão de células pequenas, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma epidermóide do pulmão, cancro do peritoneu, cancro hepatocelular, cancro gástrico ou do estômago incluindo cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro do colo do útero, cancro do ovário, cancro do fígado, cancro da bexiga, cancro do trato urinário, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro rectal, cancro colorrectal, carcinoma do endométrio ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, cancro do rim ou renal, cancro da próstata, cancro da vulva, cancro da tiróide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, melanoma, mieloma múltiplo e linfoma de células B, cérebro, bem como cancro da cabeça e do pescoço, e metástases associadas. Nalgumas concretizações, o cancro é seleccionado a partir do grupo que consiste em cancro do pulmão de células pequenas, neuroblastomas, melanoma, carcinoma da mama, cancro gástrico, cancro colorrectal (CRC), e carcinoma hepatocelular.

Os anticorpos do invento são também úteis no tratamento (incluindo prevenção) de distúrbios cuja patologia envolve degeneração ou disfunção celular, tais como tratamento de vários distúrbios neurodegenerativos (crónicos) e lesões agudas de células nervosas. Tais distúrbios neurodegenerativos incluem, sem limitação, neuropatias periféricas; distúrbios neuromotores, tais como esclerose lateral amiotrófica (ELA, doença de Lou Gehrig), paralisia de Bell, e várias condições envolvendo atrofia ou paralisia muscular espinal; e outras doenças neurodegenerativas humanas, tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, esclerose múltipla, coreia de Huntington, Síndrome de Down, surdez nervosa e doença de

Meniere, e lesões agudas de células nervosas, por exemplo, devido a traumatismo ou ferimento da medula espinal.

A actividade de Notch1 tem sido implicada no desenvolvimento de uma variedade de sistemas de células estaminais e progenitoras iniciais, tanto na fase de desenvolvimento como adulta. Ver, p. ex., Chirba, S. (2006) *Stem Cells* 24: 2437-2447. Por conseguinte, são também proporcionados métodos para a expansão de células não diferenciadas terminalmente ("células precursoras") através da modulação da via de Notch numa célula precursora de modo a que a diferenciação da célula precursora seja inibida. Tal como aqui utilizado, "células precursoras" deverá significar qualquer célula não diferenciada terminalmente. A célula precursora é de preferência uma célula estaminal ou progenitora. São também proporcionados métodos para a expansão de células precursoras em populações contendo células precursoras através da activação da via de Notch nas células de modo a que a diferenciação da célula estaminal seja inibida. Mais, as células precursoras podem ser isoladas a partir de uma população celular, se desejado, antes ou após a via de activação de Notch. A activação da via de Notch é de preferência alcançada através do contacto da célula com um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1.

Um aspecto é tratar a população celular desejada com agonistas da via de Notch e depois permitir que estas células proliferem em cultura antes do seu transplante de volta para a região apropriada, ou transplantando-as directamente sem lhes permitir necessariamente proliferar *in vitro*. Podem ser utilizados antagonistas para inverter ou neutralizar a acção do agonista da função de Notch.

As populações de células estaminais expandidas do presente invento podem ser transplantadas para um indivíduo para o tratamento de doença ou lesão ou para terapia génica através de qualquer método conhecido na técnica que seja apropriado para o tipo de células estaminais a transplantar e para o local do transplante. Células estaminais hematopoéticas podem ser transplantadas por via intravenosa, tal como células estaminais do fígado que se localizarão no

fígado. Células estaminais neurais podem ser transplantadas directamente para o cérebro no local da lesão ou doença.

Além das utilizações de anticorpos antagonistas anti-NRR de Notch1 aqui descritas, anticorpos agonistas anti-NRR de Notch1 são também úteis para tratamentos ou composições para a modulação de estados de doença associados a expressão e/ou actividade de Notch1 e/ou uma interrupção de qualquer via biológica de Notch1 e/ou ligando de Notch1 biologicamente relevante.

São também proporcionados métodos para tratamento ou prevenção de um distúrbio imunológico, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento. Nalguns aspectos, o distúrbio imunológico é um distúrbio resultando do desenvolvimento ou regulação anormal de células T (ver, p. ex., McKenzie *et al.*, *Expert. Opin. Ther. Targets* 9: 395-410, 2005).

São também proporcionados métodos para tratamento ou prevenção de uma doença auto-imune, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento. Nalguns aspectos, a doença auto-imune é diabetes auto-imune, esclerose múltipla, ou artrite reumatóide.

São também proporcionados métodos para tratamento ou prevenção de rejeição de transplantes, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento.

São também proporcionados métodos para promoção da regeneração e/ou reparação de tecidos, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo agonista anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento. Nalguns aspectos o método envolve a promoção da regeneração e/ou reparação de osso ou músculo esquelético ou cardíaco.

O invento proporciona também métodos e composições úteis para a modulação de estados de doença associados a expressão e/ou actividade de Notch1, tais como aumento da expressão e/ou actividade, ou expressão e/ou actividade indesejada.

Num aspecto, o invento proporciona anticorpos para utilização em métodos para tratamento ou prevenção de um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular associado a maior expressão e/ou actividade de Notch1, os métodos compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento.

Num aspecto, o invento proporciona métodos para inibição de angiogénese compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento.

Num aspecto, o invento proporciona métodos para tratamento de uma condição patológica associada a angiogénese compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NRR de Notch1 a um indivíduo a necessitar de tal tratamento. Nalgumas concretizações, a condição patológica associada a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Nalgumas concretizações, a condição patológica associada a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

Em certos aspectos um imunoconjugado compreendendo um anticorpo conjugado com um ou mais agentes citotóxicos é administrado ao indivíduo. Nalguns aspectos, o imunoconjugado e/ou antigénio ao qual está ligado é/são internalizados pela célula, resultando em maior eficácia terapêutica do imunoconjugado na morte da célula alvo à qual se liga. Num aspecto, o agente citotóxico direcciona-se a ou interfere com ácido nucleico na célula alvo. Num aspecto, o agente citotóxico direcciona-se a ou interfere com a polimerização dos microtúbulos. Exemplos de tais agentes citotóxicos incluem qualquer um dos agentes quimioterapêuticos aqui observados (tal como um maitansinóide, auristatina, dolastatina, ou uma caliqueamicina), um isótopo radioactivo, ou uma ribonuclease ou uma ADN-endonuclease.

Os anticorpos do invento podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com outras composições numa terapia. Por exemplo, um anticorpo do invento pode ser co-administrado com outro anticorpo, agente ou agentes quimioterapêuticos (incluindo misturas de agentes quimioterapêuticos), outro ou outros agentes citotóxicos, agente ou agentes anti-angiogénicos, citocinas, e/ou agente ou agentes inibidores do crescimento. Quando um anticorpo do invento inibe o crescimento tumoral, pode ser particularmente desejável combiná-lo com um ou mais outros agentes terapêuticos que também inibam o crescimento tumoral. Alternativamente, ou adicionalmente, o indivíduo pode receber terapia de radiação combinada (p. ex., irradiação com feixe externo ou terapia com um agente radioactivo marcado, tal como um anticorpo). Tais terapias combinadas observadas acima incluem a administração combinada (em que dois ou mais agentes estão incluídos na mesma formulação ou em formulações separadas) e administração separada, caso em que a administração do anticorpo do presente invento pode ocorrer antes, e/ou após, a administração da terapia ou terapias adjuvantes.

Terapias de Combinação

Tal como indicado acima, o invento proporciona terapias combinadas em que um anticorpo anti-NRR de Notch1 é administrado com outra terapia. Por exemplo, os anticorpos anti-NRR de Notch1 são utilizados em combinação com produtos terapêuticos anticancro ou um produto terapêutico anti-neovascularização para tratar várias condições neoplásicas ou não neoplásicas. A condição neoplásica ou não neoplásica é caracterizada por distúrbio patológico associado a angiogénese aberrante ou indesejada. O anticorpo anti-NRR de Notch1 pode ser administrado em série ou em combinação com outro agente que seja eficaz para estes fins, ou na mesma composição ou em composições separadas. Alternativamente, ou adicionalmente, podem ser administrados múltiplos inibidores de Notch1.

A administração do anticorpo anti-NRR de Notch1 pode ser feita simultaneamente, p. ex., como uma simples composição ou

como duas ou mais composições distintas utilizando a mesma ou diferentes vias de administração. Alternativamente, ou adicionalmente, a administração pode ser feita sequencialmente, por qualquer ordem. Em certos aspectos, podem estar presentes intervalos variando de minutos a dias ou de semanas a meses, entre as administrações das duas ou mais composições. Por exemplo, o agente anticancro pode ser administrado primeiro, seguido do inibidor de Notch1. No entanto, está também contemplada a administração simultânea ou a administração do anticorpo anti-NRR de Notch1 primeiro.

As quantidades eficazes de agentes terapêuticos em combinação com um anticorpo anti-NRR de Notch1 estarão à descrição do médico assistente ou do veterinário. A administração e ajuste da dosagem são feitos para alcançar uma gestão máxima das condições a tratar. A dose dependerá adicionalmente de factores tais como o tipo de agente terapêutico a utilizar e o indivíduo específico a tratar. Dosagens adequadas para o agente anticancro são aquelas actualmente utilizadas e podem ser reduzidas devido à acção combinada (sinergia) do agente anticancro e do anticorpo anti-NRR de Notch1. Em certos aspectos, a combinação de inibidores potencia a eficácia de um único inibidor. O termo "potencia" refere-se a uma melhoria na eficácia de um agente terapêutico na sua dose comum ou aprovada.

Tipicamente, os anticorpos anti-NRR de Notch1 e os agentes anticancro são adequados para as mesmas ou para doenças semelhantes para bloquear ou reduzir um distúrbio patológico tal como o crescimento tumoral ou o crescimento de uma célula de cancro. Numa concretização o agente anticancro é um agente anti-angiogénese.

Agentes anticancro exemplares incluem um agente alquilante, um antagonista de folato, um antagonista de pirimidina, um antibiótico citotóxico, um composto de platina ou um composto à base de platina, um taxano, um alcalóide vinca, um inibidor de c-Kit, um inibidor de topoisomerase, um inibidor anti-angiogénese tal como um inibidor anti-VEGF, um inibidor de HER-2, um inibidor de EGFR ou duplo inibidor das cinases EGFR/HER-2, um anti-estrogénio tal como fulvestrant, e um agente de terapia hormonal, tal como carboplatina,

cisplatina, gemcitabina, capecitabina, epirrubicina, tamoxifeno, um inibidor de aromatase, e prednisona. Nalgumas concretizações, o cancro é cancro colorrectal e o segundo medicamento é um inibidor de EGFR tal como erlotinib, um inibidor anti-VEGF tal como bevacizumab, ou é cetuximab, arinotecan, irinotecan, ou FOLFOX, ou o cancro é cancro da mama e o segundo medicamento é um modulador anti-estrogénio tal como fulvestrant, tamoxifeno ou um inibidor de aromatase tal como letrozol, exemestano ou anastrozol, ou um inibidor de VEGF tal como bevacizumab, ou é um agente quimioterapêutico tal como doxorubicina, e/ou um taxano tal como paclitaxel, ou é um inibidor anti-HER-2 tal como trastuzumab, ou um duplo inibidor das cinases EGFR/HER-2 tal como lapatinib ou um sub-regulador de HER-2 tal como 17AAG (derivado de geldanamicina, que é um veneno de proteína de choque térmico [Hsp] 90) (por exemplo, para cancros da mama que tenham progredido com trastuzumab). Noutras concretizações, o cancro é cancro do pulmão, tal como cancro do pulmão de células pequenas, e o segundo medicamento é um inibidor de VEGF tal como bevacizumab, ou um inibidor de EGFR tal como, p. ex., erlotinib ou um inibidor de c-Kit tal como, p. ex., imatinib.

A terapia anti-angiogénica em relação a cancro é uma estratégia de tratamento de cancro dirigida à inibição do desenvolvimento dos vasos sanguíneos do tumor necessários para proporcionar nutrientes para suportar o crescimento do tumor. Como a angiogénese está envolvida tanto no crescimento do tumor primário como na metástase, o tratamento anti-angiogénico proporcionado pelo invento é capaz de inibir o crescimento neoplásico do tumor no local primário, bem como prevenir a metástase de tumores em locais secundários, permitindo assim o ataque dos tumores por outros produtos terapêuticos.

Muitos agentes anti-angiogénicos foram identificados e são conhecidos na técnica, incluindo os listados aqui, p. ex., listados em Definições, e por, p. ex., Carmeliet e Jain, *Nature* 407: 249-257 (2000); Ferrara *et al.*, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3: 391-400 (2004); e Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003). Ver também, Pedido de Patente U.S. US20030055006. Num aspecto, um anticorpo anti-NRR de Notch1 é

utilizado em combinação com um anticorpo neutralizante anti-VEGF (ou fragmento) e/ou outro antagonista de VEGF ou um antagonista do receptor de VEGF incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, receptor de VEGF solúvel (p. ex., VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, fragmentos de neuropilinas (p. ex., NRP1, NRP2)), aptâmeros capazes de bloqueio de VEGF ou VEGFR, anticorpos neutralizantes anti-VEGFR, inibidores de baixo peso molecular das tirosina-cinases de VEGFR (RTK), estratégias anti-sentido para VEGF, ribozimas contra VEGF ou receptores de VEGF, variantes de antagonistas de VEGF, e quaisquer combinações destes. Alternativamente, ou adicionalmente, dois ou mais inibidores da angiogénese podem ser opcionalmente co-administrados ao indivíduo além do antagonista de VEGF e de outro agente. Em certos aspectos, um ou mais agentes terapêuticos adicionais, p. ex., agentes anticancro, podem ser administrados em combinação com o anticorpo anti-NRR de Notch1, o antagonista de VEGF, e um agente anti-angiogénese.

Em certos aspectos do invento, outros agentes terapêuticos úteis para combinação de terapia tumoral com um anticorpo anti-NRR de Notch1 incluem outras terapia de cancro (p. ex., cirurgia, tratamentos radiológicos (p. ex., envolvendo irradiação ou administração de substâncias radioactivas), quimioterapia, tratamento com agentes anticancro listados aqui e conhecidos na técnica, ou combinações destes). Alternativamente, ou adicionalmente, dois ou mais anticorpos que se ligam ao mesmo ou a dois ou mais antigénios diferentes aqui divulgados podem ser co-administrados ao indivíduo. Por vezes, pode ser benéfico administrar também uma ou mais citocinas ao indivíduo.

Agentes Quimioterapêuticos

Em certos aspectos, o invento proporciona anticorpos para utilização num método de bloqueio ou redução do crescimento tumoral ou crescimento de uma célula de cancro, através da administração de quantidades eficazes de um antagonista de Notch1 e/ou um ou mais inibidores de angiogénese e um ou mais agentes quimioterapêuticos a um indivíduo susceptível a, ou diagnosticado com, cancro. Uma variedade de agentes quimioterapêuticos pode ser utilizada

nos métodos de tratamento combinados do invento. Uma lista exemplificativa e não limitativa de agentes quimioterapêuticos contemplados é aqui proporcionada em "Definições" e alguns são descritos acima.

Tal como será entendido pelos vulgares peritos na técnica, as doses apropriadas de agentes quimioterapêuticos estarão geralmente em torno das já empregues em terapias clínicas em que os quimioterapêuticos são administrados sozinhos ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos. A variação na dosagem ocorrerá provavelmente dependendo da condição a tratar. O médico que administra o tratamento será capaz de determinar a dose apropriada para o indivíduo.

Crescimento Tumoral Recidivo

O invento proporciona também anticorpos para utilização em métodos e composições para inibir ou prevenir o crescimento tumoral recidivo ou o crescimento de células de cancro recidivo. O crescimento tumoral recidivo ou o crescimento de células de cancro recidivo é utilizado para descrever uma condição na qual os indivíduos submetidos ou tratados com uma ou mais terapias actualmente disponíveis (p. ex., terapias de cancro, tais como quimioterapia, terapia de radiação, cirurgia, terapia hormonal e/ou terapia biológica/imunoterapia, terapia de anticorpos anti-VEGF, particularmente um regime terapêutico padrão para o cancro em particular) não é clinicamente adequada para tratar os indivíduos ou os indivíduos já não recebem qualquer efeito benéfico da terapia de modo a que estes indivíduos necessitam de terapia eficaz adicional. Tal como aqui utilizada, a frase pode também referir-se a uma condição do indivíduo "não responsiva/refractária" p. ex., descrevendo indivíduos que respondem à terapia mas sofrem de efeitos secundários, desenvolvem resistência, não respondem à terapia, não respondem satisfatoriamente à terapia, etc. Em várias concretizações, um cancro é crescimento tumoral recidivo ou crescimento de células de cancro recidivo quando o número de células de cancro não foi significativamente reduzido, ou aumentou, ou o tamanho do tumor não foi significativamente reduzido, ou aumentou, ou não se consegue qualquer outra

redução no tamanho ou no número de células de cancro. A determinação de se as células de cancro são crescimento tumoral recidivo ou crescimento de células de cancro recidivo pode ser feita quer *in vivo* quer *in vitro* através de qualquer método conhecido na técnica para ensaio da eficácia do tratamento em células de cancro, utilizando os significados aceites na técnica de "recidivo" ou "refractário" ou "não responsivo" num tal contexto. Um tumor resistente a tratamento anti-VEGF é um exemplo de um crescimento tumoral recidivo.

O invento proporciona anticorpos para utilização em métodos de bloqueio ou redução de crescimento tumoral recidivo ou crescimento de células de cancro recidivo num indivíduo através da administração de um ou mais anticorpos anti-NRR de Notch1 para bloquear ou reduzir o crescimento tumoral recidivo ou crescimento de células de cancro recidivo num indivíduo. Em certas concretizações, o antagonista pode ser administrado subsequentemente ao terapêutico de cancro. Noutras concretizações, o anticorpo anti-NRR de Notch1 é administrado simultaneamente com terapia de cancro. Alternativamente, ou adicionalmente, a terapia de anticorpo anti-NRR de Notch1 alterna com outra terapia de cancro, que pode ser realizada por qualquer ordem. O invento engloba também métodos para administração de um ou mais anticorpos inibitórios para prevenir o surgimento ou a recorrência de cancro em indivíduos com predisposição para ter cancro. Em geral, o indivíduo era ou é simultaneamente submetido a terapia de cancro. Numa concretização, a terapia de cancro é tratamento com um agente anti-angiogénese, p. ex., um antagonista de VEGF. O agente anti-angiogénese inclui aqueles conhecidos na técnica e aqueles verificados sob as Definições aqui. Numa concretização, o agente anti-angiogénese é um anticorpo ou fragmento de neutralização anti-VEGF (p. ex., A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Ver, p. ex., Patentes U.S. 6582959, 6884879, 6703020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; Pedidos de Patente US 20030206899, 20030190317, 20030203409, e 20050112126; Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288: 149-164 (2004); e, WO2005012359. Agentes adicionais podem ser administrados em combinação com antagonista de VEGF e um anticorpo anti-NRR de

Notch1 para bloqueio ou redução de crescimento tumoral recidivo ou crescimento de células de cancro recidivo, p. ex., ver secção aqui intitulada Terapias de Combinação.

Os compostos do invento (p. ex., anticorpos anti-NRR de Notch1) são administrados a um indivíduo (p. ex., um paciente humano), de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa como bolo ou através de infusão contínua ao longo de um período de tempo, através de, por exemplo, via oral, tópica, ou por inalação, parentérica, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, e, se desejado para tratamento local, administração intra-lesão. Infusões parentéricas incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intracerebrospinal, intra-sinovial, intra-tecal, ou subcutânea. A administração local é particularmente desejada se estiverem associados efeitos secundários extensivos ou toxicidade com inibição da sinalização de Notch. Uma estratégia *ex vivo* pode também ser utilizada para aplicações terapêuticas. Estratégias *ex vivo* envolvem, por exemplo, transfecção ou transdução de células obtidas do indivíduo com um polinucleótido codificando um anticorpo anti-NRR de Notch1. As células transfectadas ou transduzidas são então devolvidas ao indivíduo. As células podem ser de qualquer um de uma ampla variedade de tipos, incluindo, sem limitação, células hematopoéticas (p. ex., células de medula óssea, macrófagos, monócitos, células dendríticas, células T ou células B), fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, ou células musculares.

Além disso, o anticorpo pode ser administrado adequadamente através de infusão por pulsos, particularmente com doses decrescentes do anticorpo. De preferência, a dosagem é dada através de injeções, de preferência injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte de se a administração é breve ou crónica.

Noutro exemplo, o anticorpo anti-NRR de Notch1 é administrado localmente, p. ex., através de injeções directas, quando o distúrbio ou localização do tumor o permite, e as injeções podem ser repetidas periodicamente. O anticorpo anti-NRR de Notch1 pode também ser distribuído

sistemicamente ao indivíduo ou directamente às células tumorais, p. ex., a um tumor ou um leito tumoral após excisão cirúrgica do tumor, a fim de prevenir ou reduzir a recorrência local ou metástase.

Alternativamente, uma molécula ou polinucleótido inibidor de ácido nucleico contendo uma sequência de ácido nucleico codificando um anticorpo anti-NRR de Notch1 pode ser distribuída às células apropriadas no indivíduo. Em certos aspectos, o ácido nucleico pode ser dirigido para o próprio tumor.

O ácido nucleico pode ser introduzido nas células através de qualquer meio apropriado para o vector empregue. Muitos desses métodos são bem conhecidos na técnica (Sambrook *et al.*, *supra*, e Watson *et al.*, *Recombinant DNA*, Capítulo 12, 2ª edição, Scientific American Books, 1992). Exemplos de métodos de distribuição génica incluem transfecção mediada por lipossomas, electroporação, métodos de fosfato de cálcio/DEAE dextrano, biolística, e microinjecção.

A dosagem pode ser através de qualquer via adequada, p. ex., através de injecções, tais como injecções intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte de se a administração é breve ou crónica. A composição de anticorpo do invento será formulada, doseada e administrada de uma forma consistente com a boa prática médica. Factores para consideração neste contexto incluem o distúrbio particular a tratar, o mamífero particular a tratar, a condição clínica de cada indivíduo, a causa do distúrbio, o local de distribuição do agente, o método de administração, o programa de administração e outros factores conhecidos dos médicos. O anticorpo não necessita de ser, mas é opcionalmente formulado com um ou mais agentes actualmente utilizados para prevenir ou tratar o distúrbio em questão. A quantidade eficaz de tais outros agentes depende da quantidade de anticorpos do invento presente na formulação, do tipo de distúrbio ou tratamento, e de outros factores discutidos acima. Estes são geralmente utilizados nas mesmas dosagens e com vias de administração como aqui anteriormente utilizadas ou de cerca de 1 a 99% das dosagens até agora empregues.

Para a prevenção ou o tratamento de doença, a dosagem apropriada de um anticorpo do invento (quando utilizado isoladamente ou em combinação com outros agentes tais como agentes quimioterapêuticos) dependerá do tipo de doença a tratar, do tipo de anticorpo, da gravidade e do curso da doença, de se o anticorpo é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia anterior, da história clínica do indivíduo e da resposta ao anticorpo, e da descrição do médico assistente. O anticorpo é adequadamente administrado ao indivíduo de uma vez ou durante uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e da gravidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 15 mg/kg (p. ex., 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticorpo é uma dosagem inicial candidata para administração ao indivíduo, seja, por exemplo, numa ou mais administrações separadas, ou através de infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar entre cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores mencionados acima. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença. Uma dosagem exemplar do anticorpo seria no intervalo de cerca de 0,05 mg/kg até cerca de 10 mg/kg. Assim, uma ou mais doses de cerca de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ou 10 mg/kg (ou qualquer combinação destas) podem ser administradas ao indivíduo. Tais doses podem ser administradas intermitentemente, p. ex., todas as semanas ou de três em três semanas (p. ex., de modo a que o indivíduo receba de cerca de dois a cerca de vinte, p. ex., cerca de seis doses do anticorpo). Pode ser administrada uma dose de carga inicial superior, seguida por uma ou mais doses inferiores. Um regime de dosagem exemplar compreende a administração de uma dose de carga inicial de cerca de 4 mg/kg, seguida por uma dose de manutenção semanal de cerca de 2 mg/kg do anticorpo. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado através de técnicas e ensaios convencionais.

Os anticorpos anti-NRR de Notch1 do invento são também úteis em ensaios de detecção de expressão de Notch1 (tais como ensaios de diagnóstico ou prognóstico) em células ou tecidos específicos em que os anticorpos são marcados tal

como descrito abaixo e/ou são imobilizados numa matriz insolúvel.

São também proporcionados métodos para detecção de Notch1, os métodos compreendendo a detecção de complexo Notch1-anticorpo anti-NRR de Notch1 na amostra. O termo "detecção" tal como aqui utilizado inclui detecção qualitativa e/ou quantitativa (medição dos níveis) com ou sem referência a um controlo.

São também proporcionados métodos para diagnóstico de um distúrbio associado a expressão e/ou actividade de Notch1, os métodos compreendendo a detecção de complexo Notch1-anticorpo anti-NRR de Notch1 numa amostra biológica de um indivíduo possuindo ou suspeito de possuir o distúrbio. Nalgumas concretizações, a expressão de Notch1 é expressão aumentada ou expressão anormal (indesejada). Nalguns aspectos, o distúrbio é um tumor, cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Alternativamente ou além da detecção da expressão Notch1, nos métodos de diagnóstico ou tratamento aqui descritos, a expressão de ligandos de Notch1 numa amostra biológica pode ser determinada. A expressão do ligando de Notch1 pode ser determinada utilizando métodos padrão na técnica.

Num outro aspecto, qualquer um dos anticorpos anti-NRR de Notch1 aqui descrito, pode compreender um marcador detectável.

É também proporcionado um complexo de qualquer um dos anticorpos anti-NRR de Notch1 aqui descritos e Notch1. Nalguns aspectos, o complexo é *in vivo* ou *in vitro*. Nalguns aspectos, o complexo compreende uma célula de cancro. Nalguns aspectos, o anticorpo anti-NRR de Notch1 é marcado de forma detectável.

Os anticorpos anti-NRR de Notch1 podem ser utilizados para a detecção de Notch1 em qualquer um de vários métodos de ensaio de detecção bem conhecidos. Por exemplo, uma amostra biológica pode ser ensaiada quanto a Notch1 através da obtenção da amostra a partir de uma fonte desejada, mistura da amostra com anticorpo anti-NRR de Notch1 para permitir que

o anticorpo forme um complexo anticorpo/Notch1 com qualquer Notch1 presente na mistura, e detecção de qualquer complexo anticorpo/Notch1 presente na mistura. A amostra biológica pode ser preparada para ensaio através de métodos conhecidos na técnica que sejam adequados para a amostra particular. Os métodos de mistura da amostra com anticorpos e os métodos de detecção de complexo anticorpo/Notch1 são escolhidos de acordo com o tipo de ensaio utilizado. Tais ensaios incluem ensaios de imuno-histoquímica, competitivos e em sanduíche, e ensaios de inibição esteroquímica.

Os métodos analíticos para Notch1 utilizam todos um ou mais dos seguintes reagentes: análogo de Notch1 marcado, análogo de Notch1 imobilizado, anticorpo anti-NRR de Notch1 marcado, anticorpo anti-NRR de Notch1 imobilizado e conjugados esteroquímicos. Os reagentes marcados também são conhecidos como "traçadores".

O marcador utilizado é qualquer funcionalidade detectável que não interfira com a ligação de Notch1 e o anticorpo anti-NRR de Notch1. São conhecidos vários marcadores para utilização em imunoensaio, exemplos incluindo porções que possam ser detectadas directamente, tais como fluorocromos, marcadores quimioluminescentes, e radioactivos, bem como porções, tais como enzimas, que devem reagir ou ser derivados para serem detectados. Exemplos de tais marcadores incluem os radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I , fluoróforos tais como quelatos de terras raras ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferases, p. ex., luciferase do pirilampo e luciferase bacteriana (Pat. U.S. No. 4737456), luciferina, 2,3-di-hidroftalazinodionas, peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina, β -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacárido-oxidases, p. ex., glicose-oxidase, galactose-oxidase, e glicose-6-fosfato-desidrogenase, oxidases heterocíclicas tais como uricase e xantina-oxidase, ligadas com uma enzima que emprega peróxido de hidrogénio para oxidar um precursor corante tal como HRP, lactoperoxidase, ou microperoxidase, biotina/avidina, marcadores de spin, marcadores de bacteriófagos, radicais livres estáveis e semelhantes.

Estão disponíveis métodos convencionais para ligar covalentemente estes marcadores a proteínas ou polipéptidos. Por exemplo, agentes de acoplamento tais como dialdeídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, benzidina bis-diazotizada e semelhantes podem ser usados para marcar os anticorpos com os marcadores fluorescentes, quimioluminescentes e enzimáticos acima descritos. Ver, por exemplo, Pat. U.S. Nos. 3940475 (fluorimetria) e 3645090 (enzimas); Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); e Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Marcadores preferidos aqui são enzimas tais como peroxidase de rábano e fosfatase-alcalina. A conjugação de tal marcador, incluindo as enzimas, ao anticorpo é um procedimento de manipulação padrão para um vulgar perito em técnicas de imunoensaio. Ver, por exemplo, O'Sullivan *et al.* "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", em *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone e H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), págs. 147-166.

A imobilização dos reagentes é necessária para certos métodos de ensaio. A imobilização implica separar o anticorpo anti-NRR de Notch1 de qualquer Notch1 ou NRR de Notch1 que permaneça livre em solução. Isto é convencionalmente realizado através de insolubilização do anticorpo anti-NRR de Notch1 ou análogo de NRR de Notch1 antes do procedimento do ensaio, tal como através de adsorção a uma matriz ou superfície insolúvel em água (Bennich *et al.*, Patente U.S. No. 3720760), através de ligação covalente (por exemplo, usando reticulação com glutaraldeído), ou através de insolubilização do anticorpo anti-NRR de Notch1 ou análogo de NRR de Notch1 depois, p. ex., através de imunoprecipitação.

A expressão de proteínas numa amostra pode ser examinada utilizando imuno-histoquímica e protocolos de coloração. A coloração imuno-histoquímica de secções de tecido demonstrou ser um método fiável de avaliar ou detectar a presença de proteínas numa amostra. As técnicas de imuno-histoquímica ("IHC") utilizam um anticorpo para sondar e visualizar antigénios celulares *in situ*, geralmente através de métodos

cromogénicos ou fluorescentes. Para a preparação das amostras, pode ser utilizada uma amostra de tecido ou células de um mamífero (tipicamente um ser humano). Exemplos de amostras incluem, mas não estão limitadas a, células de cancro tais como células de cancro do cólon, da mama, da próstata, do ovário, do pulmão, do estômago, do pâncreas, de linfoma e leucemia. A amostra pode ser obtida através de uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a excisão cirúrgica, aspiração ou biopsia. O tecido pode ser fresco ou congelado. Num aspecto, a amostra é fixada e impregnada em parafina ou semelhante. A amostra de tecido pode ser fixada (i. e., conservada) através de metodologia convencional. Um vulgar perito na técnica apreciará que a escolha de um fixador é determinada pelo objectivo para o qual a amostra é corada histologicamente ou analisada de outra forma. Um vulgar perito na técnica apreciará também que a duração da fixação depende do tamanho da amostra de tecido e do fixador utilizado.

A IHC pode ser realizada em combinação com técnicas adicionais tais como coloração morfológica e/ou hibridação de fluorescência *in situ*. Estão disponíveis dois métodos gerais de IHC; ensaios directos e indirectos. De acordo com o primeiro ensaio, a ligação do anticorpo ao antigénio alvo (p. ex., NRR de Notch1) é determinada directamente. Este ensaio directo utiliza um reagente marcado, tal como um marcador fluorescente ou um anticorpo primário marcado com enzima, que pode ser visualizado sem qualquer interacção do anticorpo. Num ensaio indirecto típico, o anticorpo primário não conjugado liga-se ao antigénio e, em seguida, um anticorpo secundário marcado liga-se ao anticorpo primário. Quando o anticorpo secundário é conjugado com um marcador enzimático, é adicionado um substrato cromogénico ou fluorogénico para proporcionar a visualização do antigénio. A amplificação de sinal ocorre porque vários anticorpos secundários podem reagir com diferentes epitopos no anticorpo primário.

O anticorpo primário e/ou secundário utilizado para imuno-histoquímica será tipicamente marcado com uma porção detectável. Estão disponíveis vários marcadores que podem ser geralmente agrupados nas seguintes categorias:

Para além dos procedimentos de preparação da amostra discutidos acima, pode ser desejado tratamento posterior da secção de tecido antes, durante ou após a IHC, por exemplo, podem ser realizados métodos de recuperação do epitopo, tal como aquecimento da amostra de tecido em tampão citrato (ver, p. ex., Leong et al. *Appl. Immunohistochem.* 4(3): 201 (1996)).

Após um passo opcional de bloqueio, a secção de tecido é exposta ao anticorpo primário durante um período de tempo suficiente e sob condições adequadas de modo a que o anticorpo primário se ligue ao antigénio da proteína alvo na amostra de tecido. As condições apropriadas para alcançar isto podem ser determinadas através de experimentação de rotina. A extensão da ligação do anticorpo à amostra é determinada através da utilização de qualquer um dos marcadores detectáveis acima discutidos. De preferência, o marcador é um marcador enzimático (p. ex., HRP) que catalisa uma alteração química do substrato cromogénico tal como o cromogénio 3,3'-diaminobenzidina. De preferência, o marcador enzimático é conjugado com um anticorpo que se liga especificamente ao anticorpo primário (p. ex., o anticorpo primário é anticorpo policlonal de coelho e o anticorpo secundário é anticorpo de cabra anti-coelho).

Os espécimes assim preparados podem ser montados e cobertos com lamela. A avaliação da lâmina é então determinada, p. ex., utilizando um microscópio, e podem ser empregues os critérios de intensidade de coloração rotineiramente utilizados na arte. Os critérios de intensidade de coloração podem ser avaliados como se segue:

TABELA 2

Padrão de Coloração	Pontuação
Não é observada coloração nas células.	0
É detectada coloração ligeira/quase imperceptível em mais de 10% das células.	1+
É observada coloração fraca a moderada em mais de 10% das células.	2+
É observada coloração moderada a forte em mais de 10% das células.	3+

Tipicamente, uma pontuação do padrão de coloração de cerca de 2+ ou superior num ensaio de IHC é diagnóstica e/ou prognóstica. Nalguns aspectos, uma pontuação do padrão de coloração de cerca de 1+ ou superior é diagnóstica e/ou prognóstica. Noutros aspectos, uma pontuação do padrão de coloração de cerca de 3 ou superior é diagnóstica e/ou prognóstica. Entende-se que quando as células e/ou tecido de um tumor ou adenoma do cólon são examinados utilizando IHC, a coloração é geralmente determinada ou avaliada em células tumorais e/ou tecido (em oposição ao tecido do estroma ou envolvente que possa estar presente na amostra).

Outros métodos de ensaio, conhecidos como ensaios competitivos ou em sanduíche, estão bem estabelecidos e amplamente utilizados na indústria de diagnóstico comercial.

Os ensaios competitivos baseiam-se na capacidade de um análogo de NRR de Notch1 traçador para competir com a NRR de Notch1 da amostra de teste para um número limitado de locais do anticorpo anti-NRR de Notch1 de ligação ao antigénio. O anticorpo anti-NRR de Notch1 é em geral insolubilizado antes ou após a competição e em seguida o traçador e Notch1 ou a NRR de Notch ligada ao anticorpo anti-NRR de Notch1 são separados do traçador e Notch1 ou NRR de Notch1 não ligados. Esta separação é realizada através de decantação (quando o parceiro de ligação foi pré-insolubilizado) ou através de centrifugação (quando o parceiro de ligação foi precipitado após a reacção competitiva). A quantidade de Notch I ou NRR de Notch1 da amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de traçador ligado tal como medido através da quantidade de substância marcadora. Curvas de dose-resposta com quantidades conhecidas de NRR de Notch1 são preparadas e comparadas com os resultados dos testes para determinar quantitativamente a quantidade de Notch1 ou NRR de Notch1 presente na amostra de teste. Estes ensaios são chamados sistemas ELISA quando são utilizadas enzimas como marcadores detectáveis.

Outra espécie de ensaio competitivo, denominado ensaio "homogéneo", não necessita de uma separação de fases. Aqui, um conjugado de uma enzima com o Notch1 ou NRR de Notch1 é

preparado e usado de modo a que quando o anticorpo anti-NRR de Notch1 se liga ao Notch1 ou NRR de Notch1 a presença do anticorpo anti-NRR de Notch1 modifica a actividade da enzima. Neste caso, o Notch ou NRR de Notch1 ou fragmentos destes imunologicamente activos são conjugados com uma ponte orgânica bifuncional a uma enzima tal como peroxidase. Os conjugados são seleccionados para utilização com o anticorpo anti-NRR de Notch1 de modo que a ligação do anticorpo anti-NRR de Notch1 inibe ou potencia a actividade enzimática do marcador. Este método *per si* é amplamente praticado sob o nome de EMIT.

Conjugados estereoquímicos são usados em métodos de impedimento estereoquímico para ensaio homogéneo. Estes conjugados são sintetizados através de ligação covalente de um hapteno de baixo peso molecular a um pequeno fragmento de NRR de Notch1 de modo a que o anticorpo para o hapteno seja substancialmente incapaz de se ligar ao conjugado ao mesmo tempo que o anticorpo anti-NRR de Notch1. Sob este procedimento de ensaio a NRR de Notch1 presente na amostra de teste ligar-se-á ao anticorpo anti-NRR de Notch1, permitindo assim que o anti-hapteno se ligue ao conjugado, resultando numa alteração no carácter do hapteno conjugado, p. ex., uma alteração na fluorescência quando o hapteno é um fluoróforo.

Os ensaios em sanduíche são particularmente úteis para a determinação de Notch1, NRR de Notch1, ou anticorpos anti-NRR de Notch1. Em ensaios em sanduíche sequenciais é utilizado um anticorpo anti-NRR de Notch1 imobilizado para adsorver Notch1 ou NRR de Notch1 da amostra de teste, a amostra de teste é removida através de lavagem, o Notch1 ou NRR de Notch1 ligado é utilizado para adsorver um segundo anticorpo marcado anti-NRR de Notch1 e o material ligado é então separado do traçador residual. A quantidade de traçador ligado é directamente proporcional ao Notch1 ou NRR de Notch1 da amostra de teste. Em ensaios em sanduíche "simultâneos" a amostra de teste não é separada antes da adição do anti-NRR de Notch1 marcado. Um ensaio em sanduíche sequencial utilizando um anticorpo monoclonal anti-NRR de Notch1 como anticorpo e um anticorpo policlonal anti-NRR de Notch1 tal como o outro é útil para testar amostras quanto a Notch1 ou NRR de Notch1.

O anterior são ensaios de detecção meramente exemplificativos para Notch1 de NRR de Notch1. Outros métodos desenvolvidos agora ou no futuro que utilizam anticorpos anti-NRR de Notch1 para a determinação de Notch1 ou NRR de Notch1 são incluídos no âmbito do presente documento, incluindo os bioensaios aqui descritos.

São também aqui proporcionados métodos para detectar (p. ex., a presença ou ausência ou a quantidade de) um ou mais polinucleótidos (p. ex., polinucleótidos de Notch1) numa amostra biológica de um indivíduo, tal como um indivíduo humano. Uma variedade de métodos para a detecção de polinucleótidos pode ser empregue e inclui, por exemplo, RT-PCR, ensaio de expressão génica TaqMan®, métodos de amplificação, *microarrays* de polinucleótidos, e semelhantes.

Os métodos para a detecção de polinucleótidos (tais como ARNm) são bem conhecidos e incluem, por exemplo, ensaios de hibridação utilizando sondas de ADN complementares (tais como hibridação *in situ* utilizando ribossondas de Notch1 marcadas), *Northern blot* e técnicas relacionadas, e vários ensaios de amplificação de ácidos nucleicos (tais como RT-PCR utilizando iniciadores complementares específicos para Notch1, e outros métodos de detecção do tipo de amplificação, tais como, por exemplo, ADN ramificado, SPIA (amplificação isotérmica com um único iniciador), Ribo-SPIA, SISBA, NASBA (amplificação baseada na sequência do ácido nucleico), TMA (amplificação mediada por transcrição), e semelhantes).

Amostras biológicas de mamíferos podem ser convenientemente ensaiadas quanto a, p. ex., ARNm de Notch1 utilizando *Northern blot*, *dot blot*, ou análise de PCR. Por exemplo, ensaios de RT-PCR tais como ensaios de PCR quantitativa são bem conhecidos na técnica. Um método para detecção de ARNm de Notch1 numa amostra biológica compreende a produção de ADNc a partir da amostra através de transcrição inversa utilizando pelo menos um iniciador; amplificação do ADNc assim produzido utilizando um polinucleótido de Notch1 como iniciadores com sentido e anti-sentido para amplificar os ADNc de Notch1 aí; e detecção da presença ou ausência do ADNc de Notch1 amplificado. Além disso, tais métodos podem

incluir um ou mais passos que permitam determinar a quantidade (níveis) de ARNm de Notch1 numa amostra biológica (p. ex., através do exame simultâneo dos níveis de uma sequência de ARNm de controlo comparativa de um gene de manutenção tal como um membro da família da actina). Opcionalmente, pode ser determinada a sequência do ADNc de Notch1 amplificado.

As sondas e/ou iniciadores podem ser marcados com um marcador detectável, tal como, por exemplo, um radioisótopo, composto fluorescente, composto bioluminescente, composto quimioluminescente, quelante de metal ou enzima. Tais sondas e iniciadores podem ser utilizados para detectar a presença de polinucleótidos de Notch1 numa amostra e como um meio para detectar uma célula expressando proteínas Notch1. Tal como será entendido pelo perito na técnica, um grande número de iniciadores e sondas diferentes pode ser preparado (p. ex., com base nas sequências aqui proporcionadas) e utilizado eficazmente para amplificar, clonar e/ou determinar a presença ou ausência de e/ou quantidade de ARNm de Notch1.

Métodos opcionais incluem protocolos compreendendo a detecção de polinucleótidos, tais como polinucleótido de Notch1, numa amostra de tecido ou células utilizando tecnologias de *microarrays*. Por exemplo, utilizando *microarrays* de ácido nucleico, amostras de ARNm de teste e de controlo a partir de amostras de tecido de teste e de controlo são transcritas de forma inversa e marcadas para gerar sondas de ADNc. As sondas são então hibridadas com um *array* de ácidos nucleicos imobilizados num suporte sólido. O *array* é configurado de modo a que a sequência e a posição de cada membro do *array* seja conhecida. Por exemplo, uma selecção de genes que têm potencial para ser expressos em certos estados de doença pode ser disposta num suporte sólido. A hibridação de uma sonda marcada com um determinado membro do *array* indica que a amostra da qual a sonda foi derivada expressa esse gene. Análise de expressão génica diferencial do tecido de doença pode proporcionar informação valiosa. A tecnologia de *microarrays* utiliza técnicas de hibridização de ácidos nucleicos e tecnologia computacional para avaliar o perfil de expressão do ARNm de milhares de genes dentro de uma única experiência (ver, p. ex., WO

01/75166 publicado a 11 de Outubro de 2001). (Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5700637; Patente U.S. No. 5445934; Patente U.S. No. 5807522; Lockart, *Nature Biotechnology*, 14: 1675-1680 (1996); e Cheung, VG et al., *Nature Genetics* 21 (Supl): 15-19 (1999) para uma discussão de fabricação dos *arrays*). Os *microarrays* de ADN são *arrays* em miniatura, contendo fragmentos de genes que são sintetizados directamente ou aplicados sobre vidro ou outros substratos. Milhares de genes são geralmente representados num único *array*. Uma experiência típica de *microarrays* envolve as seguintes etapas: (1) preparação de alvo marcado com fluorescência a partir do ARN isolado a partir da amostra, (2) hibridação do alvo marcado com o *microarray*, (3) lavagem, coloração, e varrimento do *array*, (4) análise da imagem digitalizada, e (5) geração de perfis de expressão génica. Actualmente estão a ser utilizados dois tipos principais de *microarrays* de ADN: *arrays* oligonucleotídicos (geralmente 25 a 70 meros) e *arrays* de expressão génica contendo produtos de PCR preparados a partir de ADNc. Na formação de um *array*, os oligonucleótidos podem ser pré-fabricados e aplicados na superfície ou sintetizados directamente sobre a superfície (*in situ*).

O sistema Affymetrix GeneChip[®] é um sistema de *microarrays* comercialmente disponível que compreende *arrays* fabricados através de síntese directa de oligonucleótidos sobre uma superfície de vidro. *Arrays* de Sonda/Gene: Oligonucleótidos ("oligos"), geralmente 25 meros, são sintetizados directamente sobre uma bolacha de vidro através de uma combinação de fotolitografia baseada em semicondutores e tecnologias de síntese química de fase sólida. Cada *array* contém até 400000 oligonucleótidos diferentes e cada oligonucleótido está presente em milhões de cópias. Como as sondas oligonucleotídicas são sintetizadas em locais conhecidos no *array*, os padrões de hibridação e a intensidade dos sinais pode ser interpretada em termos de identidade do gene e níveis de expressão relativa através do suporte lógico Affymetrix Microarray Suite. Cada gene é representado no *array* através de uma série de diferentes sondas oligonucleotídicas. Cada par de sondas consiste num oligonucleótido de correspondência perfeita e num oligonucleótido não correspondente. A sonda de

correspondência perfeita tem uma sequência exactamente complementar ao gene particular e mede assim a expressão do gene. A sonda sem correspondência difere da sonda de correspondência perfeita numa única substituição de bases na posição de base central, perturbando a ligação do transcrito do gene alvo. Isto ajuda a determinar a hibridação de fundo e não específica que contribui para o sinal medido para o oligonucleótido de correspondência perfeita. O suporte lógico Microarray Suite subtrai as intensidades de hibridação das sondas sem correspondência das das sondas de correspondência perfeita para determinar o valor de intensidade absoluto ou específico para cada conjunto de sondas. As sondas são escolhidas com base em informação actual do GenBank e outros repositórios de nucleótidos. Crê-se que as sequências reconheçam regiões únicas da extremidade 3' do gene. É utilizado um Forno de Hibridação GeneChip (forno "assador") para realizar a hibridação de até 64 arrays de uma só vez. A estação de fluidos realiza lavagem e coloração dos arrays de sondas. Este é totalmente automatizado e possui quatro módulos, sendo que cada módulo suporta um array de sondas. Cada módulo é controlado de forma independente através de suporte lógico Microarray Suite usando protocolos fluídicos pré-programados. O digitalizador é um digitalizador de fluorescência a laser confocal que mede a intensidade de fluorescência emitida pelo ARNc marcado ligado aos arrays de sondas. A estação de trabalho do computador com suporte lógico Microarray Suite controla a estação de fluidos e o digitalizador. O suporte lógico Microarray Suite pode controlar até oito estações de fluidos utilizando protocolos pré-programados de hibridização, lavagem, e coloração para o array de sondas. O suporte lógico também adquire e converte dados de intensidade de hibridação num resultado de presença/ausência para cada gene utilizando algoritmos apropriados. Finalmente, o suporte lógico detecta alterações na expressão génica entre experiências através de análise de comparação e formatos que resultam em ficheiros .txt, que podem ser utilizados com outros programas de suporte lógico para mais análise de dados.

Nalguns aspectos, é detectada deleção do gene de Notch1, mutação do gene, ou amplificação do gene. A deleção do gene, mutação do gene, ou amplificação pode ser medida através de

qualquer um de uma ampla variedade de protocolos conhecidos na técnica, por exemplo através de *Southern blotting* convencional, *Northern blotting* para quantificar a transcrição de ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 (1980)), *dot blotting* (análise de ADN), ou hibridação *in situ* (p. ex., hibridação fluorescente *in situ* ("FISH")), utilizando uma sonda devidamente marcada, métodos de citogenética ou hibridação genómica comparativa (CGH) utilizando uma sonda marcada de forma apropriada. Além disso, estes métodos podem ser empregues para detectar deleção do gene de ligando de Notch1, mutação do ligando, ou amplificação do gene. Tal como aqui utilizado, "detecção de expressão de Notch1" engloba detecção de deleção do gene de Notch1, mutação do gene, ou amplificação do gene.

Adicionalmente, pode-se examinar o estado de metilação do gene de Notch1 numa amostra de tecido ou de células. Desmetilação e/ou hipermetilação aberrante de ilhas de CpG nas regiões reguladoras 5' do gene ocorre frequentemente em células imortalizadas e transformadas, e pode resultar em expressão alterada de vários genes. Uma variedade de ensaios para exame do estado de metilação de um gene são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, pode-se utilizar, em abordagens de hibridação *Southern*, enzimas de restrição sensíveis a metilação, que não podem clivar sequências que contenham locais CpG metilados para avaliar o estado de metilação das ilhas de CpG. Além disso, MSP (PCR específica de metilação) pode rapidamente traçar o perfil do estado de metilação de todos os locais CpG presentes numa ilha CpG de um dado gene. Este procedimento envolve a modificação inicial do ADN através de bissulfito de sódio (que converterá todas as citosinas não metiladas em uracilo) seguido por amplificação utilizando iniciadores específicos para ADN metilado versus não metilado. Protocolos envolvendo interferência de metilação podem também ser verificados, por exemplo, em *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidade 12, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995; De Marzo *et al.*, *Am. J. Pathol.* 155(6): 1985-1992 (1999); Brooks *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 531-536 (1998)); e Lethe *et al.*, *Int. J. Cancer* 76(6): 903-908 (1998). Tal como aqui utilizado, "detecção da expressão de Notch1" engloba a detecção de metilação do gene de Notch1.

Artigos de Fabrico

É também proporcionado um artigo de fabrico contendo materiais úteis para o tratamento, a prevenção e/ou o diagnóstico dos distúrbios descritos acima. O artigo de fabrico compreende um recipiente e uma etiqueta ou folheto informativo sobre ou associado ao recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição que é por si só ou em combinação com outra ou outras composições eficaz para tratar, prevenir e/ou diagnosticar a condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco possuindo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente activo na composição é um anticorpo do invento. A etiqueta ou folheto indica que a composição é utilizada para tratamento da condição de escolha, tal como cancro. Além disso, o artigo de fabrico pode compreender (a) um primeiro recipiente com uma composição contida nele, em que a composição compreende um anticorpo do invento; e (b) um segundo recipiente com uma composição contida nele, em que a composição compreende um outro agente citotóxico. O artigo de fabrico nesta concretização do invento pode ainda compreender um folheto informativo indicando que a primeira e segunda composições de anticorpo podem ser usadas para tratar uma determinada condição, p. ex., cancro. Alternativamente, ou adicionalmente, o artigo de fabrico pode ainda compreender um segundo (ou terceiro) recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (ABPI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

A seguir estão exemplos dos métodos e das composições do invento. Entende-se que várias outras concretizações podem ser praticadas, dada a descrição geral fornecida acima.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Geração do Imunogénio para Geração de Anticorpos Anti-NRR de Notch1

hNotch1 NRR

O imunogénio contendo a NRR de Notch1 humano (hNotch1 NRR) foi obtido como se segue.

Subclonagem de Expressão

Utilizando um clone inteiro de Notch1 humano (número de acesso GenBank NM_017617) como sequência de referência e molde, um conjunto de 4 iniciadores de PCR foram concebidos para amplificar uma região de Notch1 abrangendo os aminoácidos de V1307 até Q1733 de SEQ ID NO:56. Esta região inclui 34-36 repetições de EGF e termina pouco antes do domínio transmembranar. Os iniciadores 5' foram desenhados para adicionar uma Flag Tag N-terminal imediatamente a montante da sequência específica do gene. O produto de PCR correspondendo a este domínio foi clonado no vector B9.1 para expressão segregada em células de insecto *Sf-9* utilizando o procedimento de Clonagem de Restrição Independente (RIC). Resumidamente, os iniciadores continham extensões 5' necessárias para adicionar porções dos locais de restrição *Bam*HI e *Eco*RI a dois produtos de PCR independentes gerados usando polimerase *Pfu* (Stratagene). A desnaturação e recombinação destes produtos de PCR produziu uma população de ADN, na qual 25% dos produtos continham os nucleótidos apropriados para representar pontas soltas *Bam*HI e *Eco*RI nas suas extremidades 5' e 3', respectivamente. Esta mistura de ADN foi então ligada no vector B9.1 preparado através de digestão de restrição com *Bam*HI e *Eco*RI. A construção resultante foi verificada em relação à sequência de ADN e foi-lhe dado o nome 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9. O Vector B9.1 é uma versão modificada do vector de transferência de ADN de baculovírus pACGP67 (BD Pharmingen) que contém um sinal de secreção de Gp67 antes do local de clonagem *Bam*HI, um local de clivagem por trombina C-terminal e uma etiqueta His.

As sequências relevantes para a clonagem da construção de Notch1 humano são mostradas abaixo:

Iniciadores de PCR:

Directo:

[Fosf]gatccGATTACAAAGATGACGATGACAAGggctctggtGTCATAATGGCTGCAAA
GGCAAG (SEQ ID NO:48)

Inverso: cCTGCGCCGGCGGGGGCGGCTCCACG (SEQ ID NO:49)

Directo:

cGATTACAAAGATGACGATGACAAGggctctggtGTCATCAATGGCTGCAAAGGCAAG
(SEQ ID NO:50)

Inverso: [fosf]aatcCTGCGCCGGCGGGGGCGGCTCCACG (SEQ ID NO:51)

As maiúsculas representam sequências específicas do gene de Notch1; as minúsculas representam os locais de restrição adicionados; o sublinhado representa a etiqueta Flag.

Sequência de ADN da proteína expressa:

**atgctactagtaaatacgtcacaccaaggcttcaataaggaacacacaagcaagatggtg
agcgctattgtttatgtgcttttggcggcggcggcgccattctgcctttgcggcggat
ctggatccgattacaaagatgacgatgacaagggctctggtGTCATCAATGGCTGCAAA
GGCAAGCCCTGCAAGAAATGGGGGCACCTGCGCCGTGGCCTCCAACACCGCCCGCGGGTTC
ATCTGCAAGTGCCCTGCGGGCTTCGAGGGCGCCACGTGTGAGAATGACGCTCGTACCTGC
GGCAGCCTGCGCTGCCTCAACGGCGGCACATGCATCTCCGGCCCGCGCAGCCCCACCTGC
CTGTGCCTGGGCCCCCTTACGGGCCCCGAATGCCAGTTCCCGGCCAGCAGCCCCTGCCTG**

GGCGGCAACCCCTGCTACAACCAGGGGACCTGTGAGCCCACATCCGAGAGCCCCTTCTAC
 CGTTGCCTGTGCCCCGCCAAATTCAACGGGGCTCTTGTGCCACATCCTGGACTACAGCTTC
 GGGGGTGGGGCCGGGCGCGACATCCCCCGCCGCTGATCGAGGAGGCGTGCGAGCTGCCC
 GAGTGCCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCTGCAGCCTGCAGTGCAACAACCACGCGTGC
 GGCTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTTCAATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCAG
 TCTCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGCCACTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCC
 GGCTGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTGCGGAAGGCCAGTGCAACCCCCTGTAC
 GACCAGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGCACTGCGACCAGGGCTGCAACAGCGCG
 GAGTGCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCGGC
 ACGCTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGCCGAGCAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTC
 CTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGGC
 CAGCAGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGCGAGGAGGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAG
 CGTGCCGCCGAGGGCTGGGCCGCACCTGACGCCCTGCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTG
 CTCCCTGGTGGCAGCGAGGGTGGGCGGCGGCGGAGGGAGCTGGACCCCATGGACGTCCGC
 GGCTCCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCAGTGTGTGCAGGCCTCCTCGCAGTGC
 TTCCAGAGTGCCACCGACGTGGCCGCATTCTGGGAGCGCTCGCCTCGCTGGGCAGCCTC
 AACATCCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGAGACCGTGGAGCCGCCCGCCGGCG
 CAGgaattcggctgtgtccgctggcagcggtcatcaccatcaccatcac (SEQ ID NO:55)

Sequência da proteína expressa:

mllvnqshqgfnkehtskmvsaiivlyvllaaaahsafaadlgsdykdddkgsgVINGCKGKPKNGGTCAVASNTARGFI
 CKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTICISGPRSP TCLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPCY
 NQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCS
 LQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSCNSAGCLFDGFDQRAE
 GQCNP LYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRN
 SSFHLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPKRAAEGWAAPDALLGQVKA
 SLLPGGSEGRRRRELDPM DVRSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFLGALASLGS LNIP
 YKIEAVQSETVEPPPPAQefglvprgsgghhhhh (SEQ ID NO:13)

As maiúsculas representam sequências específicas do gene de Notch1 e as minúsculas representam o sinal de secreção de Gp67, a etiqueta Flag N-terminal, o local de trombina, a etiqueta Flag C-terminal, e quaisquer resíduos adicionados pelo vector de expressão.

Geração da Reserva de Baculovírus e Produção de Proteína

A construção codificando os aminoácidos V1307-Q1733 de Notch1 humano foi expressa em células Sf-9. As reservas de baculovírus foram produzidas utilizando os vectores de

transferência de ADN [101V-1]: 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1 (ver secção de subclonagem de expressão). O ADN do vector de transferência foi co-transfectado para células de insecto *Sf-9* aderentes cultivadas em meio livre de proteínas ESF921 (Expression Systems LLC, Woodland CA.) a 27°C com ADN viral linearizado BacPak6™ (BD Clontech, Palo Alto CA) e Bacfectin™ (BD Clontech) de acordo com as recomendações do fabricante. A reserva viral P1 resultante foi amplificada duas vezes para produzir a reserva viral P3 usada para produção de proteína em larga escala. As células *Sf-9* cultivadas em suspensão em meio ESF921 foram infectadas a uma densidade celular de 1 a 2×10^6 células/ml utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) estimada de 0,3 partículas virais por célula que foram colhidas 3-5 dias após a infecção. As células *Sf-9* foram removidas através de centrifugação, a reserva viral resultante foi filtrada para assegurar a esterilidade, e soro fetal bovino (FBS) a 3% inactivado pelo calor foi adicionado para estabilidade viral. Todas as reservas virais foram armazenadas a 4°C. Mostrou-se que a reserva viral contendo a construção [101V-1]: 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1 infecta células *Sf-9* eficientemente e expressa a proteína recombinante.

A construção [101V-1]: 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1 foi expressa em 2 fermentações à escala de 11 e 16 litros. Células *Sf-9* adaptadas a crescimento em suspensão em meio isento de proteína foram utilizadas para as fermentações. As células foram inoculadas a uma densidade de $\approx 2 \times 10^6$ células/ml a partir de um biorreactor de sementeira com condições de operação semelhantes às do vaso de produção. As fermentações foram realizadas a 27°C em meio ESF 921 e o nível de oxigénio dissolvido foi controlado a 50% de saturação do ar utilizando oxigénio aspergido quando necessário e arejamento contínuo do espaço vazio. Os biorreactores foram operados a uma agitação de 100 rpm utilizando 2 impulsores de lâminas inclinadas ou uma pá de lâmina achatada, dependendo do vaso utilizado. As células cresceram até ao ponto de infecção, uma densidade de $\approx 2,0$ a $2,7 \times 10^6$ células/ml, ao longo de um período de 24 a 48 horas e foram então infectadas a uma MOI de 0,5 partículas virais/célula com a reserva viral codificando o polipéptido Notch1. As células foram monitorizadas quanto a sinais de

infecção (paragem do crescimento, aumento do diâmetro das células), e foram cultivadas durante mais 65-72 horas. O meio resultante foi arrefecido, recolhido através de centrifugação, e submetido a purificação imediata das proteínas.

Purificação do imunogénio contendo hNotch1 NRR

O meio sobrenadante de células *SF9* expressando polipéptido codificado pela construção 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1 foi diluído (v/v=1:4) com tampão A gelado (Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM e fluoreto de fenilmetanossulfonilo) e os lotes foram ligados durante 15-20 minutos a resina superflow pré-equilibrada Ni-NTA (Qiagen, Produto No. 30450) a uma razão de 2 ml de resina por litro de meio. A resina de afinidade Ni-NTA foi colhida por filtração através de um filtro de 0,8 µm (Nalgene, Produto No. 450-0080) e subsequentemente empacotada numa coluna de gotejamento por gravidade apropriada (d:a, 1:10). A coluna foi lavada com 10 volumes da coluna (VC) de tampão B gelado (Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 1000 mM, CaCl₂ 5 mM e imidazol 10 mM) seguido de 10 VC de tampão A sem PMSF. A coluna foi então eluída com 5 VC de tampão A contendo imidazol 250 mM (sem PMSF). A proteína eluída foi concentrada utilizando um concentrador Amicon Ultra (3000 MWCO) e o tampão mudado para tampão de armazenamento (Hepes 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e CaCl₂ 5 mM) utilizando colunas PD-10 (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. A pureza da proteína foi estimada como sendo >90% através de SDS-PAGE com coloração de Coomassie. A concentração da proteína purificada foi estimada através do ensaio de Bradford (estojo Coomassie Plus, Pierce, No. Cat. 23236) utilizando BSA como padrão. A sequenciação peptídica através de espectrometria de massa de uma digestão triptica da proteína foi utilizada para confirmar a identidade.

mNotch1 NRR

O imunogénio contendo a NRR de Notch1 de ratinho (mNotch1 NRR) foi obtido como se segue.

A sequência abrangendo os aminoácidos V1307 a Q1723 de Notch1 de ratinho (SEQ ID NO:57) foi subclonada e expressa geralmente tal como descrito acima para o imunogénio de Notch1 humano. Esta região de Notch1 de ratinho inclui 34-36 repetições de EGF e termina pouco antes do domínio transmembranar. A construção expressando o imunogénio é referida como 64794.G1.Notch1.V1307-Q1723 (N-Flag, C-His).pRK5-GNE. A sequência de aminoácidos da proteína expressa para o imunogénio utilizada para gerar anticorpos contra a NRR de Notch1 de ratinho é como se segue e contém uma etiqueta FLAG N-terminal e uma etiqueta His C-terminal:

**MGGTAARLGA VILFVVIVGL HGVRGKDYKD DDDKLEVING
CRGKPCCKNGG VCAVASNTAR GFICRCPAGF EGATCENDAR
TCGSLRCLNG GTCISGPRSP TCLCLGSFTG PECQFPASSP
CVGSNPCYNQ GTCEPTSENP FYRCLCPAKF NGLLCHILDY
SFTGGAGRDI PPPQIEEACE LPECQVDAGN KVCNLQCNNH
ACGWDGGDCS LNFNDPWKNC TQSLQCWKYF SDGHCDSDQCN
SAGCLFDGFD CQLTEGQCNP LYDQYCKDHF SDGHCDQGCN
SAECEWDGLD CAEHVPERLA AGTLVLVLL PPDQLRNNSF
HFLRELSHVL HTNVVFKRDA QGQQMIFPYY GHEEELRKHP
IKRSTVGWAT SSLLPGTSGG RQRRELDPM D IRGSIVYLEI
DNRQCQVSSS QCFQSATDVA AFLGALASLG SLNIPYKIEA
VKSEPVEPPL PSQSGHHHH HH (SEQ ID NO:14)**

O terminal N da sequência acima (aminoácidos MGGTAARLGA VILFVVIVGL HGVRG de SEQ ID NO:14) é clivado pelas células expressando a proteína. Como tal, o imunogénio utilizado para gerar anticorpos específicos de NRR de Notch1 de ratinho não possui esta sequência N-terminal.

Produção de Proteína

A construção codificando os aminoácidos V1307-Q1723 de Notch1 de ratinho foi expressa transientemente em células Freestyle 293-F que foram adaptadas a cultura de suspensão isenta de soro (Células FreeStyle 293-F Invitrogen catálogo # R790-07).

As células foram cultivadas em Meio de Expressão GIBCO® FreeStyle 293, (Invitrogen catálogo #12338-018). As células foram mantidas a uma densidade de 0,3 a 3×10^6 células viáveis/ml num balão de agitação incubado a 37°C em atmosfera

húmida de CO₂ a 8% numa plataforma de agitação rotativa orbital a 125 rpm. No dia antes da transfecção as células foram semeadas a uma densidade de 5×10^5 células viáveis/ml. No dia da transfecção, as células foram verificadas quanto à viabilidade e densidade (>90% e 1×10^6 células/ml). Para cada transfecção, foi preparado um complexo lípido-ADN como se segue: Para 500 ml de células a 1×10^6 células/ml, 500 µg de ADN plasmídico foram lentamente adicionados a 40 ml de Opti-MEM® I (Invitrogen catálogo # 51985-034), 500 µl de solução de polietilenimina a 1,5 µg/ml (PEI Polietilenimine, Linear, PM 25000 Polisciences catálogo #9002-98-6). A mistura foi misturada suavemente e incubada durante 20 a 30 minutos à temperatura ambiente para permitir que o complexo ADN-lípido se forme. O complexo ADN-lípido foi então lentamente adicionado às células e incubado durante 3 dias antes da colheita do meio.

A construção de mNotch1 foi expressa em dois passos de 1 litro. As células foram transfectadas a uma densidade de 0,9 a 1×10^6 células/ml, o meio foi colhido 65 a 75 horas depois quando as células estavam a uma densidade de 2,2 a $2,5 \times 10^6$ /ml e 75 a 78% viáveis.

O meio resultante foi arrefecido, colhido através de centrifugação e imediatamente utilizado para purificação do polipeptido Notch1 de ratinho contendo a NRR.

Purificação do imunogénio contendo mNotch1 NRR

O imunogénio foi purificado a partir de meio segregado por HEK 293 através do modo de fornadas utilizando agarose anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, produto No. A2220). A agarose anti-FLAG M2 em tampão B (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM) foi adicionada aos meios segregados contendo inibidores de proteases sem EDTA Completos (20 comprimidos por litro de meio, Roche) a uma razão de 5 ml de agarose por litro de meio. O meio foi então incubado a 4°C com rotação constante durante 3 horas. A agarose anti-FLAG foi colhida por filtração através de um filtro de 0,8 µm (Nalgene, produto No. 450-0080) e empacotada numa coluna de fluxo por gravidade (BioRad, produto N° 731-0003). A agarose foi lavada com 10 volumes de coluna de tampão B e, posteriormente, a

proteína foi eluída com 4 volumes da coluna de péptido FLAG a 0,1 mg/ml (Sigma-Aldrich, produto N° F3290) em tampão B. O polipéptido de Notch1 de ratinho eluído foi concentrado num concentrador Amicon Ultra (10000 MWCO, Millipore, produto No. UFC 901096) e o tampão mudado para tampão de armazenamento (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, glicerol a 5%) utilizando colunas PD-10 (GE Healthsciences, produto No. 17-0851-01). A pureza foi estimada como sendo >92% através de HPLC de fase inversa. A concentração foi determinada através de ensaio de Bradford (estojo Coomassie Plus, Pierce, produto No.23236) utilizando BSA como padrão. A identificação da proteína foi confirmada através de sequenciação peptídica de uma digestão triptica da proteína através de espectrometria de massa.

Exemplo 2: Geração de Anticorpos Anti-NRR de Notch1

Os anticorpos anti-NRR de Notch1 foram gerados como se segue.

Separação e Pesquisa de Bibliotecas para Identificar Anticorpos Anti-NRR de Notch1

O imunogénio da proteína NRR de Notch1 humana (tal como descrito acima) foi utilizado como um antigénio. Imunoplaquetas Nunc Maxisorp de 96 poços foram revestidas de um dia para o outro a 4°C com antigénio alvo (10 µg/ml) e foram bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente com tampão de bloqueio fágico PBST (solução salina tamponada com fosfato (PBS) e albumina de soro bovino (BSA) a 1% (p/v) e Tween-20 a 0,05% (v/v)). Bibliotecas fágicas de anticorpos apresentando fragmentos Fab (ver, p. ex., Lee et al., *J. Immunol. Meth.* 284: 119-132, 2004) foram adicionadas a placas de antigénio e incubadas de um dia para o outro à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas revestidas com antigénio foram lavadas dez vezes com PBT (PBS com Tween-200 a 0,05%), e os fagos ligados foram eluídos com HCl 50 mM e NaCl 500 mM durante 30 minutos e neutralizados com um volume igual de Tris base 1 M (pH 7,5). Os fagos recuperados foram amplificados em células *E. coli* XL-1 Blue. Durante os ciclos de selecção subsequentes, a incubação do fago do anticorpo com as placas revestidas com antigénio foi reduzida para 2-3

horas, e o rigor da lavagem das placas foi gradualmente aumentado.

Após 4 ciclos de peneiramento, foi observado um enriquecimento significativo. Foram apanhados 190 clones para determinar se se ligavam especificamente à NRR de Notch1 humana e as regiões variáveis de todos os 190 clones foram sequenciados através de PCR para identificar clones de sequências únicas.

Para identificar os anticorpos fágicos que se ligam a NRR de Notch1 tanto humana como de murídeo, todos os clones únicos foram testados quanto à ligação a Notch1 humano e de murídeo através de ELISA. As afinidades dos anticorpos fágicos foram classificadas utilizando ELISA de competição de aplicação única tal como descrito abaixo neste Exemplo. Os valores de IC₅₀ do anticorpo fágico foram ainda determinados utilizando ELISA competitivo de ligação a fagos essencialmente descrito em Lee, C. V., et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340: 1073-93. Resumidamente, imunoplaças NUNC Maxisorp de 96 poços foram revestidas de um dia para o outro a 4°C com 1 µg/ml de NRR1 humano ou NRR1 de murídeo, e foram bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente com tampão de bloqueio PBST (PBS e BSA a 1% e Tween 20 a 0,05%). Os fagos foram misturados com diluição em série de NRR1 humano ou de murídeo à temperatura ambiente durante 1 hora antes de a mistura ser adicionada à placa revestida com NRR1 humana e de murídeo. Os fagos ligados foram detectados com conjugados de anti-M13 com HRP, revelados com substrato TMB durante aproximadamente 5 minutos, extintos com H₃PO₄ 1 M, e lidos espectrofotometricamente a 450 nm. As curvas de competição foram ajustadas com um programa de ajuste de curvas de regressão não lineares de quatro parâmetros (Kaleidagraph, Synergy Software) para determinar os valores de IC₅₀ que foram calculados como a concentração de antígeno na fase de ligação em solução que inibiu 50% do anticorpo apresentado por fagos de se ligar ao antígeno imobilizado.

Os Anticorpos **A**, **B** e **C** foram reformatados em IgG através da clonagem das regiões V_L e V_H de clones individuais no vector LPG3 e LPG4 respectivamente, expressando transientemente em células de mamífero CHO e purificando com

uma coluna de proteína A. Estes clones foram testados quanto a reactividade cruzada com um ou mais de NRR de Notch2, NRR de Notch3, e NRR de Notch4 humanas e de murídeo, e quanto à actividade de bloqueio utilizando o ensaio de co-cultura descrito no Exemplo 5. Os resultados desta caracterização são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização de IgG anti-NRR de Notch1

Anticorpo Anti-NRR de Notch1	Liga-se a NRR1 humana/de ratinho	Liga-se a NRR2 humana/de ratinho	Liga-se a NRR3 humana/de ratinho	Liga-se a NRR4 humana/de ratinho	Bloqueio da co- cultura
Anticorpo B	Sim	Não	ND	ND	Fraco
Anticorpo A	Sim	Não	Não	Não	Forte*
Anticorpo C	Sim	Não	ND	ND	Fraco

* IC50 ≈100 ng/ml

ND=Não Determinado

Construção de Bibliotecas para Melhoria da Afinidade de Clones Derivados da Biblioteca de V_H

O Anticorpo **A** foi seleccionado para melhoria da afinidade. O fagomídeo pW0703 (derivado do fagomídeo pV0350-2b (Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340: 1073-1093 (2004)), contendo codão de terminação (TAA) em todas as posições CDR-L3 e apresentando Fab monovalente à superfície do bacteriófago M13) serviu como molde da biblioteca para enxerto de domínios variáveis de cadeias pesadas (V_H) de clones de interesse da biblioteca de V_H para maturação da afinidade. Ambas as estratégias de distribuição aleatória, dura e suave, foram usadas para maturação da afinidade. Para a distribuição aleatória dura, uma biblioteca de cadeia leve, com posições seleccionadas das três CDR de cadeia leve foi tornada aleatória utilizando aminoácidos concebidos para imitar os anticorpos humanos naturais e a degenerescência do ADN concebida foi tal como descrito em Lee et al. (*J. Mol. Biol.* 340: 1073-1093 (2004)). Para a distribuição aleatória suave, os resíduos nas posições 91-94 e 96 de CDR-L3, 28-31 e 34-35 de CDR-H1, 50, 52 e 53-58 de CDR-H2, 95-99 e 100A de CDR-H3, foram o alvo; e duas combinações diferentes de voltas de CDR, L3/H1/H2 e L3/H3, foram seleccionados para

distribuição aleatória. Para atingir as condições de distribuição aleatória suave, que introduziram a taxa de mutação de aproximadamente 50% nas posições seleccionadas, o ADN mutagénico foi sintetizado com misturas de 70-10-10-10 de bases favorecendo os de nucleótidos de tipo selvagem (Gallop *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* 37: 1233-1251 (1994)).

Estratégia de Separação de Fagos para Gerar Melhoria da Afinidade

Para a selecção da melhoria de afinidade, as bibliotecas fágicas foram submetidas a separação de placas no primeiro ciclo, seguido de três ciclos de separação de soluções. No primeiro ciclo de separação de placas, foram separadas três bibliotecas contra a placa revestida com o alvo (ECD de NRR de Notch1 humana) (placa NUNC Maxisorp) separadamente com uma entrada de fago de cerca de 3 D.O./ml em BSA a 1% e Tween 20 a 0,05% durante 2 horas a 37°C. Após o primeiro ciclo de separação de placas, foram realizados três a quatro ciclos de separação de soluções para aumentar o rigor da selecção. Para separação de soluções, fagos a 1 D.O./ml propagados a partir do primeiro ciclo de separação de placas foram incubados com 20 nM de proteína alvo biotinilada (a concentração aqui é baseada no valor da IC50 dos fagos dos clones originais) em 100 µl de tampão contendo Superblock a 1% (Pierce Biotechnology) e Tween 20 a 0,05% durante 30 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi ainda diluída 10× com Superblock a 1%, e foram aplicados 100 µl/poço nos poços revestidos com neutravidina (5 µg/ml) durante 15 minutos à temperatura ambiente com agitação suave de modo a que o alvo biotinilado se ligasse ao fago. Os poços foram lavados com PBS-Tween 20 a 0,05% dez vezes. Para determinar a ligação de fundo, os poços de controlo contendo fagos com alvos que não foram biotinilados foram capturados em placas revestidas com neutravidina. O fago ligado foi eluído com HCl 0,1 N durante 20 minutos, neutralizado através de 1/10 volume de Tris 1 M, pH 11, titulados, e propagadas para o próximo ciclo. A seguir, dois ou três ciclos de separação de soluções foram realizados juntos com dois métodos de aumento do rigor da selecção. O primeiro dos quais é para selecção da taxa "on" através da diminuição da concentração de proteína alvo de 2 nM para 0,1 nM, e o segundo dos quais é para selecção da taxa

"off" através da adição de quantidades em excesso de proteína alvo não biotinilada (100-1000 vezes mais) para competir com os ligadores mais fracos. Também, a entrada de fago foi diminuída (0,1-0,5 D.O./ml) para baixar a ligação fágica de fundo.

*ELISA de Pesquisa de Afinidade de Elevado Rendimento
(Competição de Ponto Único)*

As colónias foram colhidas a partir do terceiro e quarto ciclos de pesquisa e cultivadas de um dia para o outro a 37°C em 150 µl/poço de meio 2YT com 50 µg/ml de carbenicilina e 1E10/ml K07 em placas de 96 poços (Falcon). A partir das mesmas placas, uma colónia de fago original infectado com XL-1 foi colhida como controlo. Placas de 96 poços Maxisorp Nunc foram revestidas com 100 µl/poço de proteína alvo (2 µg/ml) em PBS a 4°C de um dia para o outro ou à temperatura ambiente durante 2 horas. As placas foram bloqueadas com 65 µl de BSA a 1% durante 30 min e 40 µl de Tween 20 a 1% durante mais 30 minutos.

O sobrenadante do fago foi diluído 1:10 em tampão (PBS com BSA a 0,5%, Tween 20 a 0,05%) de ELISA (ensaio imunossorvente ligado a enzima) com ou sem proteína alvo 10 nM num volume total de 100 µl e incubou-se durante pelo menos 1 hora à temperatura ambiente numa placa F (NUNC). 75 µl de mistura com ou sem proteína alvo foram transferidos lado a lado para as placas revestidas com proteína alvo. A placa foi agitada suavemente durante 15 minutos para permitir a captura dos fagos não ligados à placa revestida com proteína alvo. A placa foi lavada pelo menos cinco vezes com PBS-Tween 20 a 0,05%. A ligação foi quantificada através da adição de anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase de rábano (HRP), em tampão de ELISA (1:5000) e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS-Tween 20 a 0,05%, pelo menos cinco vezes. Em seguida, 100 µl/poço de uma razão 1:1 de Substrato de Peroxidase 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e Solução de Peroxidase B (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) foram adicionados ao poço e incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente. A reacção foi parada através da adição de 100 µl de Ácido Fosfórico 1 M (H₃PO₄) a cada poço e

deixou-se incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. A DO (densidade óptica) da cor amarela em cada poço foi determinada utilizando um leitor de placas de ELISA padrão a 450 nm. A redução da DO (%) foi calculada através da seguinte equação.

$$\text{Redução da DO}_{450\text{nm}} (\%) = \left[\frac{(\text{DO}_{450\text{nm}} \text{ dos poços com competidor})}{(\text{DO}_{450\text{nm}} \text{ dos poços sem competidor})} \right] * 100$$

Em comparação com a redução da DO_{450nm} (%) do poço do fago original (100%), os clones que tinham uma redução de DO_{450nm} (%) inferior a 50% foram escolhidos para análise da sequência. Clones únicos foram seleccionados para preparação fágica para determinar a afinidade de ligação (IC₅₀ do fago) através de comparação com os clones originais (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização dos clones de anticorpos de afinidade maturada.

Nome do Clone	Alterações na CDR	IC ₅₀ do Fago (nM)		Bloqueio da co-cultura
		NRR1 Humana	NRR1 de Ratinho	
Anticorpo A-1	L3/H2	0,8	0,6	+
Anticorpo A-2	L3/H2	0,5	0,5	+
Anticorpo A-3	L3/H2	0,5	2,5	+

NRR1 = NRR de Notch1

Exemplo 3: Caracterização dos Anticorpos Anti-NRR de Notch1

Para melhor caracterizar a afinidade de ligação e a cinética de ligação dos mAbs anti-NRR de Notch1, foi utilizada medição da ressonância de plasmão de superfície (SRP) com um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Resumidamente, *chips* biossensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) foram activados com cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. Anticorpo de coelho anti-humano (Pierce) foi diluído com acetato de sódio 10 mM, pH 4,8, em 20 µg/ml antes da injeção a um caudal de 5 µl/minuto para alcançar aproximadamente 3000 unidades de resposta (RU) de anticorpo

ligado. Em seguida, foi injectada etanolamina 1 M para bloquear os grupos que não reagiram. O mAb anti-NRR1 (formatado como uma IgG inteira) foi capturado pelo anti-IgG humana de coelho revestido nos *chips* para alcançar aproximadamente 200 unidades de resposta (RU). Para as medições da cinética, duas diluições em série das proteínas NRR1-ECD humana ou NRR1-ECD de murídeo (3,9 nM a 500 nM), foram injectadas em tampão PBT (PBS com Tween 20 a 0,05%) a 25°C com um caudal de 30 µl/min. As taxas de associação (k_{on}) e as taxas de dissociação (k_{off}) foram calculadas utilizando um simples modelo de ligação de um para um de Langmuir (BIAcore Evaluation Software versão 3.2). A constante de dissociação em equilíbrio (K_D) foi calculada como a razão k_{off}/k_{on} .

Os resultados desta experiência são mostrados na Tabela 5. "NA" significa que a medição não foi realizada.

Tabela 5: Afinidade de ligação e cinética de ligação dos anticorpos anti-NRR de Notch1 a polipéptidos contendo NRR de Notch1 humana e ratinho.

Anticorpo Anti-NRR de Notch1	NRR de Notch1 de Ratinho			NRR de Notch1 Humana		
	$k_{on}/$ (1/Ms)	$k_{off}/$ (1/s)	K_d (M)	$k_{on}/$ (1/Ms)	$k_{off}/$ (1/s)	K_d (M)
Anticorpo A	9,10E+04	2,10E-02	2,31E-07	8,20E+04	1,10E-02	1,34E-07
Anticorpo A-1	8,50E+04	3,30E-04	3,88E-09	6,70E+04	2,30E-04	3,43E-09
Anticorpo A-2	1,10E+05	3,40E-04	3,09E-09	8,70E+04	2,20E-04	2,53E-09
Anticorpo A-3	9,20E+04	1,20E-03	1,30E-08	6,80E+04	4,00E-04	5,88E-09

Exemplo 4: Caracterização do Epitopo dos Anticorpos Anti-NRR de Notch1

Para examinar o determinante de ligação dos Anticorpos **A**, **A-1**, e **A-2**, foram realizadas experiências de ligação utilizando fragmentos de Notch1 humano e de ratinho.

As seguintes proteínas foram utilizadas nestas experiências:

(1) hFLAG-EGF34+NRR-His6 (101V)- o imunogénio Notch1 humano, descrito no Exemplo 1, *supra*.

(2) hFLAG-NRR-His6 (102V): contém os aminoácidos E1447-Q1733 de Notch1 humano, um etiqueta FLAG, um etiqueta HIS e um local de clivagem por trombina. A porção Notch1 inclui as sequências de LNR_A, LNR_B, LNR_C, HD_N, HD_C. Esta proteína não inclui quaisquer sequências de repetição semelhantes a EGF.

(3) hFLAG-HD-His6 (103V); contém os aminoácidos R1568 a Q1733 de Notch1 humano, um etiqueta FLAG, um local de clivagem por trombina e uma etiqueta HIS. A porção Notch1 contém sequências de HD_N e HD_C. Esta proteína não contém quaisquer sequências de repetição semelhantes a EGF e não contém as três regiões LNR.

(4) mFLAG-EGF34+NRR-His6: o imunogénio de murídeo, descrito no Exemplo 1, *supra*.

(5) mEGF34+NRR-L1597H-FLAG-TEV-Fc: contém os aminoácidos V1307 a Q1723 de Notch1 de ratinho com uma mutação L1597H, uma etiqueta Flag, uma etiqueta Fc, e um local de protease TEV. A mutação L1597H resulta em activação de Notch1, e é descrita em, p. ex., Weng *et al.*, *Science* 306: 269-271, 2004.

(6) Controlo de Flag: é um polipéptido de controlo compreendendo uma etiqueta Flag.

(7) Controlo de His: é um polipéptido de controlo compreendendo uma Etiqueta His.

Protocolo de ELISA:

1 µg/ml de proteínas em PBS, pH 7,4, foram revestidos em placas ELISA (Nunc Maxisorp) a 4°C de um dia para o outro. As placas foram bloqueadas com bloqueador de Caseína em PBS (solução salina tamponada com fosfato; Pierce) durante uma hora à temperatura ambiente. Diluições em série de 3 vezes de IgG anti-NRR de Notch1 ou IgG irrelevante em tampão PBST (tampão PBT (PBS + Tween 20 a 0,05% (v/v)) com BSA a 0,5% (p/v)) foram adicionadas às placas e incubadas durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com PBST e os anticorpos ligados foram detectados com anti-IgG humana específico de Fab de cabra conjugado com peroxidase (Sigma). O substrato TMB (3,3',5,5'-

tetrametilbenzidina) foi utilizado e uma absorvância a 650 nM foi lida utilizando um leitor de placas de ELISA padrão. A absorvância foi representada num gráfico contra concentrações de IgG usando KaleidaGraph (Suporte lógico Synergy).

O resultado desta experiência é mostrado nas Figuras 12A (Anticorpo **A**-hIgG1), 12B (Anticorpo **A-1**-hIgG1), e 12C (Anticorpo **A-2**-hIgG1). Os Anticorpos **A**, **A-1**, e **A-2** ligaram-se aos polipéptidos hFLAG-EGF34+NRR-His6 (101V), hFLAG-NRR-His6 (102V), hFLAG-HD-His6 (103V), mFLAG-EGF34+NRR-His6, e não se ligaram aos polipéptidos de controlo sem sequências de Notch1. Estes resultados demonstram que o domínio NRR de Notch1 é suficiente para ligação do Anticorpo **A**, Anticorpo **A-1**, e Anticorpo **A-2**. Os anticorpos **A**, **A-1**, e **A-2** também se ligaram à proteína mEGF34+NRR-L1597H-FLAG-TEV-Fc, que contém a mutação L1597H de activação de Notch1. Este resultado demonstra que os anticorpos são capazes de se ligar a um receptor Notch1 mutante.

Exemplo 5: Ensaios Funcionais para Anticorpos Anti-NRR de Notch1

Ensaio repórter de Notch1

Um ensaio repórter de Notch1 (também aqui designado "ensaio de co-cultura") foi realizado para medir a capacidade de um anticorpo anti-NRR de Notch1 para inibir a sinalização de Notch. Resumidamente, o ensaio envolveu os seguintes passos:

- (1) Células NIH-3T3 expressando Notch1 humano foram transfectadas com um plasmídeo repórter de luciferase que responde à sinalização Notch;
- (2) As células foram tratadas com anticorpos ou vários reagentes de controlo;
- (3) A sinalização foi iniciada através da adição de células NIH-3T3 expressando estavelmente Jagged1 humano; e
- (4) O nível de sinalização por Notch foi avaliado através da medição da actividade de luciferase, expressa a partir do plasmídeo repórter.

Em mais detalhe, o ensaio foi realizado como se segue:

(1) Células NIH-3T3 expressando estavelmente Notch1 humano (N1) foram plaqueadas numa placa de 96 poços de paredes negras, poços claros a 5000 células por poço em meio DMEM rico em glicose contendo FBS a 10% e sem antibióticos. As células foram incubadas a 37°C durante 16 horas com CO₂ a 5%. O meio foi então mudado para DMEM sem soro, e as células foram transfectadas com 100 ng/poço de um plasmídeo de luciferase TP-1 (promotor CSL, responsivo a activação de Notch) (ver, p. ex., Minoguchi *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 17: 2679-2687 (1997)) e 5 ng/ml do repórter de luciferase de Renilla pRL-CMV (Promega). A transfecção foi continuada durante 6 horas a 37°C, CO₂ a 5% com soro adicionado novamente no início da 4^a hora.

(2) No final da 6^a hora, o meio contendo os reagentes de transfecção foi removido através de aspiração, e 50 µl de DMEM/FBS foram adicionados com o seguinte: A. Meio Fresco (depois de receber as células NIH-3T3 originais de controlo para uma estimulação simulada); B. Meio Fresco (DMEM com FBS a 10%); C. Anticorpo de controlo do Isotipo de IgG Humana a 400 ng/ml; Anticorpo **A** anti-NRR de Notch1 a quatro concentrações diferentes (D. 16 ng/ml, E. 80 ng/ml, F. 400 ng/ml, G. 2000 ng/ml); H. Anticorpo **A** anti-NRR de Notch1 a 400 ng/ml pré-incubado com proteína NRR de Notch1 purificada (5 µg por poço) durante 30 minutos; I. Anticorpo de controlo do Isotipo da IgG Humana a 400 ng/ml com proteína NRR de Notch1 tratada tal como em H; J. Anticorpo **A** anti-NRR de Notch1 a 400 ng/ml pré-incubado durante 30 minutos com proteína BSA adicionada de novo (6,5 µg/poço); K. Composto E (um inibidor da gama-secretase; C₂₇H₂₄F₂N₄O₃; Seiffert *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275: 34086, 2000) a 1 µM; e L. Controlo de DMSO (apenas solvente do Composto E). Os reagentes listados acima foram incubados com as células NIH-3T3-Notch1 transfectadas durante 1 hora a 37°C, CO₂ a 5%.

5000 células NIH-3T3 expressando estavelmente o ligando Jagged1 humano foram adicionadas a cada poço, excepto para J, em que as células foram a linha parental NIH-3T3. A placa foi então incubada a 37°C, CO₂ a 5% durante 23 horas.

As actividades da luciferase de pirilampo (TP1) e de Renilla (pRL-CMV) foram medidas com o estojo Dual-Glo

Luciferase (Promega). Os níveis de sinalização de Notch foram calculados através da divisão da leitura de pirilampo pela leitura de Renilla e calculando a média de 8 repetições de cada condição. Os resultados são mostrados na Figura 7, onde as barras de erro representam o desvio padrão das repetições.

Tal como mostrado na Figura 7, o Anticorpo **A** é um potente inibidor de Notch1. O Anticorpo **A** inibe a sinalização de Notch, medida utilizando o repórter TP1-Luc. A titulação do anticorpo é mostrada; a 400 ng/ml de anticorpo, a sinalização de Notch foi inibida a 18% do controlo, o nível "on" (o nível de sinalização observado utilizando o controlo do isotipo a 400 ng/ml). A posterior adição de proteína NRR solúvel, mas não a BSA de controlo, aliviou o bloqueio induzido pelo anticorpo da sinalização, demonstrando que a inibição da sinalização pelo anticorpo foi devida a uma interação anticorpo-NRR de Notch1. O Composto E, um inibidor da gama-secretase, foi utilizado como um controlo para demonstrar a inibição. Como outro controlo, a substituição das células expressando Jagged1 por células parentais (apenas NIH-3T3, sem Jagged1), não conseguiu induzir sinalização completa, demonstrando que a sinalização requer Jagged1.

O método de ensaio de co-cultura utilizado acima foi utilizado para comparar Anticorpo **A** com os seus equivalentes de afinidade maturada Anticorpo **A-1**, Anticorpo **A-2** e Anticorpo **A-3**, com tratamento a várias concentrações. Tal como revelado a 80 ng/ml de anticorpo, o Anticorpo **A-2** e Anticorpo **A-3** mostraram um bloqueio mais potente da sinalização de Notch que o Anticorpo **A** (Figura 8).

Ensaio de Diferenciação de Mioblastos C2C12

Os mioblastos C2C12 de ratinho diferenciam-se em miotubos quando tratados com meio de diferenciação. A co-cultura com células expressando ligando Jagged1 inibe a diferenciação, estimulando a sinalização de Notch. Conforme detalhado abaixo, de acordo com a capacidade do Anticorpo **A** para inibir a sinalização de Notch1, a adição do Anticorpo **A** restaurou a diferenciação. Como controlo, um inibidor de gama-secretase também restaurou a diferenciação.

Em particular, células mioblastos C2C12 de ratinho foram plaqueadas numa placa de cultura de tecidos de 24 poços com uma lamela redonda estéril de 10 mm no fundo a $2,5 \times 10^4$ células por ml, utilizando 1 ml por poço. As células foram deixadas aderir e crescer durante 22 horas em meio de crescimento (DMEM com FBS a 10%) a 37°C, CO₂ a 5%. O meio de crescimento foi então aspirado e foi adicionado meio de diferenciação (DM) (DMEM com Soro de Cavalo a 6%). As células foram tratadas com: A. DM sozinho; B. DM com células 3T3-J1; C. DM com NIH-3T3-Jagged 1 e anticorpo de controlo do Isotipo da IgG Humana; D. DM com células 3T3-J1 e Anticorpo **A** a 200 ng/ml; E. DM com células NIH-3T3-Jagged1 e DMSO (veículo); F. DM com células 3T3-J1 e Composto E (inibidor de gama-secretase) a 1 µM. As células foram incubadas a 37°C, CO₂ a 5% sob estas condições durante quatro dias. As lamelas foram recuperadas, e as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% em PBS. As células foram então bloqueadas com FBS a 10% em PBS. Um anticorpo que reconhece a Cadeia Pesada de Miosina (Millipore, Anti-Miosina HC, ascites do clone A4.1025) e um anticorpo secundário de cabra anti-IgG de ratinho (H+L) conjugado com Alexa[®] 488 (Molecular Probes) foram utilizados para corar os miotubos diferenciados. Foi usado DAPI para contrastar os núcleos. Para cada condição foram tomadas imagens de três campos diferentes. Um subconjunto das imagens é mostrado na Figura 10. O suporte lógico Metamorph (Molecular Devices) foi utilizado para contar o número de núcleos e a área da coloração de Alexa[®] 488. A área da coloração de Alexa[®] 488 foi dividida pelo número de núcleos, calculou-se a média e representou-se graficamente. As barras de erro representam o desvio padrão das imagens em triplicado. Estes resultados são mostrados na Figura 9.

Exemplo 6: Anticorpos Anti-NRR de Notch1 Inibem a Sinalização através de Receptores Notch1 de Tipo Selvagem e Mutantes

Um ensaio de co-cultura repórter de luciferase foi realizado utilizando células NIH-3T3 transfectadas de forma transiente com os plasmídeos TP-1 e pRL-CMV codificando o receptor Notch1 mutante L1594P, receptor Notch1 mutante DelPEST, e o receptor Notch1 de tipo selvagem (wt) utilizando Reagente Lipofectamine e Lipofectamine Plus (Invitrogen), e

células NIH-3T3 expressando estavelmente Jagged-1 humano, essencialmente tal como descrito acima. A mutação L1594P indica uma mutação de leucina para prolina no aminoácido (aa) 1594 no domínio HD-N (ver, p. ex., Weng *et al.*, *Science* 306: 269-271, 2004). DelPEST indica uma deleção carboxi-terminal do domínio PEST começando no aa 2473 (ver p. ex., Malecki *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 26: 4642-4651, 2006). Consistente com os resultados publicados, os resultados mostrados na Figura 13 confirmam que ambas as deleções L1594P e DelPEST activam a sinalização de Notch1. Em relação ao controlo negativo utilizando um anticorpo monoclonal irrelevante derivado de fago do mesmo isotipo, o Anticorpo **A** inibiu a sinalização através de cada um dos três receptores de uma forma dependente da dose. O Composto E (CmpE) inibidor de gama-secretase, dissolvido em DMSO, foi utilizado como controlo positivo para inibição da sinalização de Notch. As barras negras a cheio mostram os resultados obtidos utilizando um anticorpo de controlo a 2000 ng/ml; as barras pontilhadas grosseiramente mostram os resultados obtidos utilizando o Anticorpo **A** a 80 ng/ml; as barras com riscas finas mostram os resultados obtidos utilizando o Anticorpo **A** a 400 ng/ml; as barras com riscas grossas mostram os resultados obtidos utilizando o Anticorpo **A** a 2000 ng/ml; as barras cruzadas mostram os resultados obtidos utilizando Composto E a 10 µM; e as barras com pontilhado fino mostram os resultados obtidos utilizando DMSO (o veículo para o Composto E). Os resultados para cada condição foram medidos em 8 replicados e depois expressos como o valor médio com as barras de erro a indicar o desvio padrão.

Exemplo 7: Os anticorpos anti-NRR de Notch1 perturbam a vascularização e a angiogénese

O efeito dos anticorpos anti-NRR de Notch1 na vascularização e angiogénese foi investigado utilizando um ensaio de surgimento de células HUVEC. Este ensaio é semelhante ao descrito por Nakatsu *et al.* (*Microvasc. Res.* 66 (2): 102-112, 2003). Células HUVEC foram revestidas em contas Cytodex 3[®] (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey), que foram então implantadas num gel de fibrina. Fibroblastos de pele humana foram plaqueados sobre a camada de gel de fibrina, que foi então coberta por meio de cultura de

tecidos. O surgimento de vasos a partir das células HUVEC foi examinado 4 a 9 dias mais tarde. Semelhante aos resultados observados para o tratamento anti-Dll4, o tratamento anti-NRR de Notch1 causou um aumento notável no surgimento e comprimento dos vasos, tal como mostrado na Figura 14A. Os resultados são apresentados para as células tratadas com PBS como controlo ou com Anticorpo **A** ou **A-2**, tal como indicado. O anti-NRR de Notch1 destrói a vascularização e a angiogénese através do aumento do surgimento de vasos e da densidade da rede da vasculatura.

O efeito de anticorpos anti-NRR de Notch1 na vascularização e angiogénese foi também investigado utilizando um ensaio de angiogénese da bolsa da córnea. Tal como indicado pelo protocolo resumido na Figura 14B, córneas de roedores, que são normalmente avasculares, foram implantadas com um grânulo de VEGF (#63, #132 & #390) para induzir angiogénese ou deixadas sem tratamento como controlo negativo (#381). Duas córneas foram subsequentemente tratadas com anti-Dll4 como controlo positivo para aumentos na densidade da rede vascular (#132) ou com Anticorpo **A-2** (#390). Os vasos foram visualizados com uma técnica de coloração de imunofluorescência baseada em anti-CD31 (vermelho). Tal como mostrado na Figura 14B, o tratamento anti-NRR de Notch1 aumentou significativamente a densidade da rede vascular. Os vasos nas córneas tratadas tal como descrito acima para a Figura 14B foram também perfundidos com FITC-dextrano (verde) para avaliar o fluxo através dos vasos. A perfusão através dos vasos tratados tanto com anti-Dll4 como com anti-NRR de Notch1 foi restringida, tal como mostrado na Figura 14C.

O efeito dos anticorpos anti-NRR de Notch1 num modelo de angiogénese de retina de ratinho foi também investigado. Tal como indicado pelo protocolo resumido na Figura 14D, retinas de ratinho de ratinhos P1 (dia 1 pós-natal) ou P3 (dia 3 pós-natal) foram tratadas com as concentrações indicadas do anticorpo anti-tasneira como controlo negativo ou Anticorpo **A-2**. As retinas foram colhidas em P5 (dia 5 pós-natal). Foi usada isolectina B4 para visualizar a vasculatura. Consistente com os resultados mostrados nas Figuras 14A-14C, o tratamento com anti-NRR de Notch1 aumentou a densidade da

vasculatura e gerou um fenótipo de hipersurgimento. As retinas de ratinho tratadas tal como descrito acima para a Figura 14D foram coradas com DAPI para visualizar o ADN nuclear. Tal como mostrado na Figura 14E, o tratamento anti-NRR de Notch1 causou um aumento no número de núcleos, sugerindo um possível aumento na proliferação.

Exemplo 8: Os anticorpos anti-NRR de Notch1 inibem o crescimento tumoral *in vivo*

O efeito de anticorpos anti-NRR de Notch1 no crescimento tumoral foi investigado utilizando um modelo de ratinho *in vivo*. Ratinhos imunodeficientes (Balb-C Nu/Nu) foram usados num estudo de xenoenxerto com a linha celular HM7 (adenocarcinoma do cólon). Cinco milhões de células foram implantadas em 0,1 ml de Matrigel (BD Biosciences, San Jose, Califórnia), que foi utilizado para inocular ratinhos subcutaneamente. Os tumores foram deixados crescer até aproximadamente 250-300 milímetros cúbicos antes de os ratinhos serem agrupados aleatoriamente em cada uma das três classes de tratamento para iniciar a dosagem, tal como indicado. O tratamento com Anticorpo **A-2** parou o crescimento tumoral, tal como mostrado na Figura 15A. O anti-tasneira e anti-VEGF servem como controlos negativos e positivos, respectivamente. Numa experiência semelhante à descrita acima para a Figura 15A, várias doses de Anticorpo **A-2** foram testadas quanto à capacidade de parar ou atrasar o crescimento tumoral. Os resultados são mostrados na Figura 15B. Numa experiência semelhante à descrita acima para a Figura 15A, excepto que foi utilizada a linha celular CALU6 (linha celular de cancro do pulmão de células não pequenas) em vez da linha celular HM7, verificou-se que o Anticorpo **A-2** reduz o volume tumoral, tal como mostrado na Figura 15C. Tomados em conjunto, os resultados mostrados nas Figuras 15A-15C indicam que os anticorpos anti-NRR de Notch1 inibem o crescimento tumoral.

Numa experiência semelhante à descrita acima para a Figura 15B, verificou-se que o tratamento com anticorpo **A-2** causa perda de peso de uma forma dependente da dose, tal como mostrado na Figura 15D. Numa experiência semelhante à descrita acima para a Figura 15B, a eliminação do Anticorpo

A-2 foi examinada através da medição da concentração de Fc humano no soro de ratinhos tratados nos momentos indicados. Os resultados são mostrados na Figura 15E.

Exemplo 9: Os anticorpos anti-NRR de Notch1 afectam a proliferação e diferenciação de células intestinais

O efeito dos anticorpos anti-NRR de Notch1 sobre as células no tracto intestinal de ratinho foi investigado. Os intestinos foram isolados do controlo (veículo) e os ratinhos tratados após aproximadamente 10 dias de doseamento com Anticorpo **A-2** a cada três a quatro dias. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina, mais Azul Alciano para mucina (azul, como marcador para células secretoras) ou anti-Ki-67 (castanho; procedimento de coloração imuno-histoquímica baseado em anticorpos), para a proteína marcadora proliferativa utilizada vulgarmente, Ki-67. As Figuras 16A e 16B mostram exemplos de criptas e vilosidades do intestino delgado ou intestino grosso, respectivamente, de ratinhos tratados com um anticorpo de controlo (veículo) ou com Anticorpo **A-2** na concentração indicada. Os resultados mostram que anti-NRR de Notch1 pára a proliferação de células amplificadoras do trânsito e aumenta o número de células secretoras, incluindo células caliciformes e de Paneth.

Exemplo 10: Anticorpos anti-NRR de Notch1 e inibidores de gama-secretase diminuem a viabilidade de certas linhas celulares de cancro

Os efeitos de anti-NRR de Notch1 e de inibidores da gama-secretase DAPT e "Composto E" (CmpE) num painel de linhas celulares de cancro foram examinados. As linhas celulares indicadas na Figura 17 (eixo dos xx) foram criadas na presença ou ausência de Anticorpo **A-2**, DAPT, CpmE, ou DMSO (controlo, veículo para inibidores de gama-secretase) tal como indicado, e a viabilidade das células foi avaliada utilizando o Ensaio de Viabilidade Celular Luminescente CellTiter-Glo™ (Promega, Madison, WI). Este ensaio determina o número de células viáveis em cultura com base na quantificação de ATP presente, que é uma indicação das células metabolicamente activas. A luminescência é quantificada como "unidades luminescentes relativas" na

Figura 17 (eixo dos yy). Tal como mostrado na Figura 17, MT-3, relatada como sendo uma linha de carcinoma da mama, e OVCAR-3, uma linha celular de cancro do ovário, apresentaram níveis de ATP reduzidos, indicando proliferação reduzida e/ou aumento da morte celular, após incubação na presença de DAPT, CmpE ou anti-NRR de Notch1.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Genentech, Inc. *et al.*

<120> Anticorpos anti-NRR de Notch1 e Métodos Utilizando os Mesmos

<130> 50474/013WO3

<150> US 60/994,646

<151> 2007-09-20

<150> US 60/933,072

<151> 2007-06-04

<160> 65

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile His
1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética)

<400> 2

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

Lys Gly

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 3

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Gly Ser Ala His Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 4

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Arg Ser Asn Gln Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 5

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

Lys Gly

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 6

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 8

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 9

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Ala Thr
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 11

Gln Gln Phe Tyr Thr Thr Pro Ser Thr
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 12

Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Ala Thr
1 5

<210> 13

<211> 497

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```

Met Leu Leu Val Asn Gln Ser His Gln Gly Phe Asn Lys Glu His Thr
 1      5      10      15

Ser Lys Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala
20      25      30

Ala His Ser Ala Phe Ala Ala Asp Leu Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp
35      40      45

Asp Asp Lys Gly Ser Gly Val Ile Asn Gly Cys Lys Gly Lys Pro Cys
50      55      60

Lys Asn Gly Gly Thr Cys Ala Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe
65      70      75      80

Ile Cys Lys Cys Pro Ala Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp
85      90      95

Ala Arg Thr Cys Gly Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile
100     105     110

Ser Gly Pro Arg Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Pro Phe Thr Gly
115     120     125

Pro Glu Cys Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Leu Gly Gly Asn Pro
130     135     140

Cys Tyr Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Ser Pro Phe Tyr
145     150     155     160

Arg Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu
165     170     175

Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu
180     185     190

Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn
195     200     205

Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly
210     215     220

Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln
225     230     235     240

```

Ser Leu Gln Cys Trp₂₄₅ Lys Tyr Phe Ser Asp₂₅₀ Gly His Cys Asp Ser₂₅₅ Gln
 Cys Asn Ser Ala₂₆₀ Gly Cys Leu Phe Asp₂₆₅ Gly Phe Asp Cys Gln₂₇₀ Arg Ala
 Glu Gly Gln₂₇₅ Cys Asn Pro Leu Tyr₂₈₀ Asp Gln Tyr Cys Lys₂₈₅ Asp His Phe
 Ser Asp₂₉₀ Gly His Cys Asp Gln₂₉₅ Gly Cys Asn Ser Ala₃₀₀ Glu Cys Glu Trp
 Asp Gly Leu Asp Cys Ala₃₁₀ Glu His Val Pro Glu₃₁₅ Arg Leu Ala Ala Gly₃₂₀
 Thr Leu Val Val₃₂₅ Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser₃₃₅
 Ser Phe His Phe₃₄₀ Leu Arg Glu Leu Ser₃₄₅ Arg Val Leu His Thr Asn Val₃₅₀
 Val Phe Lys₃₅₅ Arg Asp Ala His Gly₃₆₀ Gln Gln Met Ile Phe₃₆₅ Pro Tyr Tyr
 Gly Arg Glu Glu Glu Leu Arg₃₇₅ Lys His Pro Ile Lys₃₈₀ Arg Ala Ala Glu
 Gly Trp Ala Ala Pro Asp₃₉₀ Ala Leu Leu Gly Gln₃₉₅ Val Lys Ala Ser Leu₄₀₀
 Leu Pro Gly Gly Ser₄₀₅ Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro₄₁₅
 Met Asp Val Arg₄₂₀ Gly Ser Ile Val Tyr₄₂₅ Leu Glu Ile Asp Asn₄₃₀ Arg Gln
 Cys Val Gln₄₃₅ Ala Ser Ser Gln Cys₄₄₀ Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala₄₄₅
 Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala₄₅₅ Ser Leu Gly Ser Leu₄₆₀ Asn Ile Pro Tyr
 Lys Ile Glu Ala Val₄₇₀ Gln Ser Glu Thr Val Glu₄₇₅ Pro Pro Pro Pro Ala₄₈₀
 Gln Glu Phe Gly Leu₄₈₅ Val Pro Arg Gly Ser Gly His His His His₄₉₅ His

His

<210> 14

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 14

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

Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn
 225 230 235 240
 Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly
 245 250 255
 Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp
 260 265 270
 Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly
 275 280 285
 Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu
 290 295 300
 Val Leu Val Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe
 305 310 315 320
 His Phe Leu Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe
 325 330 335
 Lys Arg Asp Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His
 340 345 350
 Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp
 355 360 365
 Ala Thr Ser Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg Arg
 370 375 380
 Glu Leu Asp Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile
 385 390 395 400
 Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala
 405 410 415
 Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
 420 425 430
 Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro
 435 440 445
 Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ser Gly His His His His His His
 450 455 460

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 16

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 16
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 17
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 18
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Thr Ile
 35 40 45
 Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 50 55 60
 Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 20

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 35 40 45
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Ser

<210> 21

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 21

Gln val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser val Lys val Ser Cys Lys Ala Ser Trp val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 35 40 45
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu val Thr Val Ser Ser
 65 70 75 80

<210> 22

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 22

Gln val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser val Lys val Ser Cys Lys Ala Ser Trp val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 35 40 45
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu val Thr Val Ser Ser
 65 70 75

<210> 23

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 23

Gln val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr val Ser Gly Gly Ser val Ser Trp Ile

20					25					30					
Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Val	Thr	Ile
		35					40					45			
Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val
	50					55					60				
Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Gln	Gly
65					70					75					80
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				85											

```
<210> 24
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial
```

<220>
<223> Sintética

```

<400> 24
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1      5      10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20     25
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35     40     45
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50     55     60
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65     70     75     80
Ser

```

```
<210> 25
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial
```

<220>
<223> Sintética

```
<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1          5          10         15
```

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 35 40 45
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75 80

<210> 26
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 35 40 45
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75

<210> 27
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
 35 40 45

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 28

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 29

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 30
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 35 40 45
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75

<210> 31
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
 35 40 45
 Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 50 55 60
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 32
 <211> 81

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 32

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80

Ser

<210> 33

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75 80

<210> 34

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
 35 40 45
 Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 50 55 60
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 35

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80

Ser

<210> 36

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75 80

<210> 37

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75

<210> 38

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

<210> 39

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 39

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 20 25 30

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
 50 55 60

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

<210> 40

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 20 25 30

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
 50 55 60

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

<210> 41

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
 50 55 60

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 43
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 44
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 44
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 45
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 46
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 46

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

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

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 47

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

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

<210> 48

<211> 62

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 48

gattccgatta caaagatgac gatgacaagg gctctggtgt catcaatggc tgcaaaggca 60
ag . 62

<210> 49

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 49

cctgcgccgg cgggggcggc tccacg

26

<210> 50

<211> 58

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 50

cgattacaaa gatgacgatg acaagggctc tgggtgtcatc aatggctgca
aaggcaag 58

<210> 51

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 51

aatccctgcg ccggcggggg cggtccacg

30

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 52

Ala Arg Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala
1 5 10

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 55

<211> 1491

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

```

atgctactag taaatcagtc acaccaaggc tccaataagg aacacacaag caagatggta      60
agcgctattg cttlatatgt gcttltggcg gcggcggcgc attctgcctt tgcggcggat    120
cttggatccg attacaaaga tgacgatgac aagggctctg gtgtcatcaa tggctgcaaa    180
ggcaagccct gcaagaatgg gggcacctgc gccgtggcct ccaacaccgc ccgcgggttc    240
atctgcaagt gccctgcggg cttcgagggc gccacgtgtg agaatgacgc tcgtacctgc    300
ggcagcctgc gctgcctcaa cggcggcaca tgcattctcg gccgcgcag cccacacctgc    360
ctgtgcctgg gcccccttcac gggccccgaa tgcagttccc cggccagcag cccctgcctg    420
ggcggcaacc cctgtacaa cagggggacc tgtgagccca catccgagag ccccttctac    480
cgttgcctgt gccccgcgaa attcaacggg cctttgtgcc acatcctgga ctacagcttc    540
gggggtgggg ccgggcgcga catccccccg ccgctgatcg agggggcgtg cgagctgcc    600
gagtgcagag aggacgcggg caacaaggtc tgcagcctgc agtgcaacaa ccacgcgtgc    660
ggctgggacg gcggtgactg tcccccaac tccaatgacc cctggagaa ctycagcag    720
tctctgcagt gctggaagta ctteagtgac ggccactgtg acagccagtg caactcagcc    780
ggctgcctct tcgacggcct tgactgcccag cgtgcggaag gccagtgcaa cccctgtac    840
gaccagtact gcaaggacca cttcagcgac gggcactgcg accagggctg caacagcgcg    900
gagtgcgagt gggacgggct ggactgtgctg gaggatgtac ccgagaggct ggcygccggc    960
acgctgggtg tgggtgtgtg gatgccgcgc gaggagctgc gcaacagctc cttccacttc   1020
ctgcgggagc tcagccgcgt gctgcacacc aacgtggtct tcaagcgtga cgcacacggc   1080
cagcagatga tcttccccca ctacggccgc gaggaggagc tgcgcaagca ccccatcaag   1140
cgtgccgcgc agggctgggc cgcacctgac gccctgctgg gccaggtgaa ggcctcgcctg   1200
ctccctgggt gcagcgaggg tgggcggcgg cggaggggagc tggaccccat ggacgtccgc   1260
ggctccatcg tctacctgga gattgachac cggcagtgct tgcaggcctc ctgcagtgct   1320
ttccagagtg ccaccgacgt ggcgcattc ctgggagcgc tcgectcgtt gggcagcctc   1380
aacatccctt acaagatcga ggcgtgcag agtgagaccg tggagccgcc cccgctgggc   1440
caggaattcg gtctgggtcc gcgtggcagc ggtcatcacc atcaccatca c          1491

```

<210> 56

<211> 2555

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

```

Met Pro Pro Leu Leu Ala Pro Leu Leu Cys Leu Ala Leu Leu Pro Ala
1      5      10      15

Leu Ala Ala Arg Gly Pro Arg Cys Ser Gln Pro Gly Glu Thr Cys Leu
20      25      30

Asn Gly Gly Lys Cys Glu Ala Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys
35      40      45

Gly Gly Ala Phe Val Gly Pro Arg Cys Gln Asp Pro Asn Pro Cys Leu
50      55      60

Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp Arg Arg
65      70      75      80

Gly Val Ala Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Ser Gly Pro
85      90      95

Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Thr Asn Pro Cys Arg
100     105     110

Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg
115     120     125

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys
130     135     140

Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ala
145     150     155     160

Ser Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Ser Phe His Gly Pro Thr Cys Arg
165     170     175

Gln Asp Val Asn Glu Cys Gly Gln Lys Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
180     185     190

```

Gly Thr Cys His Asn Glu Val Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Arg Ala
 195 200 205
 Thr His Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro
 210 215 220
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Val Thr
 225 230 235 240
 His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Gln Asn Cys Glu Glu
 245 250 255
 Asn Ile Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys
 260 265 270
 Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr
 275 280 285
 Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn
 290 295 300
 Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn
 305 310 315 320
 Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile
 325 330 335
 Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe His Gly Ala Thr Cys His Asp
 340 345 350
 Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu
 355 360 365
 Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly
 370 375 380
 Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys
 385 390 395 400
 Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
 405 410 415
 Ser Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Ile Asn Thr
 420 425 430
 Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg
 435 440 445
 Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Val Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp
 450 455 460

Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro
 465 470 475 480
 Gly Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Val Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser
 485 490 495
 Ser Pro Cys Leu His Asn Gly Arg Cys Leu Asp Lys Ile Asn Glu Phe
 500 505 510
 Gln Cys Glu Cys Pro Thr Gly Phe Thr Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp
 515 520 525
 Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu
 530 535 540
 Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly
 545 550 555 560
 Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His
 565 570 575
 Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Arg
 580 585 590
 Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ser
 595 600 605
 Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Ala
 610 615 620
 Tyr Leu Cys Phe Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile
 625 630 635 640
 Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Ser Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu
 645 650 655
 Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly
 660 665 670
 Ser Met Cys Asn Ile Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Asn Pro Cys His
 675 680 685
 Asn Gly Gly Thr Cys Glu Asp Gly Ile Asn Gly Phe Thr Cys Arg Cys
 690 695 700
 Pro Glu Gly Tyr His Asp Pro Thr Cys Leu Ser Glu Val Asn Glu Cys
 705 710 715 720
 Asn Ser Asn Pro Cys Val His Gly Ala Cys Arg Asp Ser Leu Asn Gly

725								730						735					
Tyr	Lys	Cys	Asp 740	Cys	Asp	Pro	Gly	Trp 745	Ser	Gly	Thr	Asn	Cys 750	Asp	Ile				
Asn	Asn	Asn 755	Glu	Cys	Glu	Ser	Asn 760	Pro	Cys	Val	Asn	Gly 765	Gly	Thr	Cys				
Lys	Asp 770	Met	Thr	Ser	Gly	Tyr 775	Val	Cys	Thr	Cys	Arg 780	Glu	Gly	Phe	Ser				
Gly 785	Pro	Asn	Cys	Gln	Thr 790	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys 795	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys 800				
Leu	Asn	Gln	Gly	Thr 805	Cys	Ile	Asp	Asp	Val 810	Ala	Gly	Tyr	Lys	Cys 815	Asn				
Cys	Leu	Leu	Pro 820	Tyr	Thr	Gly	Ala	Thr 825	Cys	Glu	Val	Val	Leu 830	Ala	Pro				
Cys	Ala	Pro 835	Ser	Pro	Cys	Arg	Asn 840	Gly	Gly	Glu	Cys	Arg 845	Gln	Ser	Glu				
Asp	Tyr 850	Glu	Ser	Phe	Ser	Cys 855	Val	Cys	Pro	Thr	Gly 860	Trp	Gln	Gly	Gln				
Thr 865	Cys	Glu	Val	Asp	Ile 870	Asn	Glu	Cys	Val	Leu 875	Ser	Pro	Cys	Arg	His 880				
Gly	Ala	Ser	Cys	Gln 885	Asn	Thr	His	Gly	Gly 890	Tyr	Arg	Cys	His	Cys 895	Gln				
Ala	Gly	Tyr	Ser 900	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu 905	Thr	Asp	Ile	Asp	Asp 910	Cys	Arg				
Pro	Asn	Pro 915	Cys	His	Asn	Gly	Gly 920	Ser	Cys	Thr	Asp	Gly 925	Ile	Asn	Thr				
Ala	Phe 930	Cys	Asp	Cys	Leu	Pro 935	Gly	Phe	Arg	Gly	Thr 940	Phe	Cys	Glu	Glu				
Asp 945	Ile	Asn	Glu	Cys	Ala 950	Ser	Asp	Pro	Cys	Arg 955	Asn	Gly	Ala	Asn	Cys 960				
Thr	Asp	Cys	Val	Asp 965	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr 970	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser 975				
Gly	Ile	His	Cys 980	Glu	Asn	Asn	Thr	Pro 985	Asp	Cys	Thr	Glu	Ser 990	Ser	Cys				

Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu
 995 1000 1005
 Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln His Asp Val Asn
 1010 1015 1020
 Glu Cys Asp Ser Gln Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp
 1025 1030 1035
 Gly Cys Gly Ser Tyr Arg Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly
 1040 1045 1050
 Pro Asn Cys Gln Asn Leu Val His Trp Cys Asp Ser Ser Pro Cys
 1055 1060 1065
 Lys Asn Gly Gly Lys Cys Trp Gln Thr His Thr Gln Tyr Arg Cys
 1070 1075 1080
 Glu Cys Pro Ser Gly Trp Thr Gly Leu Tyr Cys Asp Val Pro Ser
 1085 1090 1095
 Val Ser Cys Glu Val Ala Ala Gln Arg Gln Gly Val Asp Val Ala
 1100 1105 1110
 Arg Leu Cys Gln His Gly Gly Leu Cys Val Asp Ala Gly Asn Thr
 1115 1120 1125
 His His Cys Arg Cys Gln Ala Gly Tyr Thr Gly Ser Tyr Cys Glu
 1130 1135 1140
 Asp Leu Val Asp Glu Cys Ser Pro Ser Pro Cys Gln Asn Gly Ala
 1145 1150 1155
 Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Tyr Ser Cys Lys Cys Val Ala
 1160 1165 1170
 Gly Tyr His Gly Val Asn Cys Ser Glu Glu Ile Asp Glu Cys Leu
 1175 1180 1185
 Ser His Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Leu Asp Leu Pro Asn
 1190 1195 1200
 Thr Tyr Lys Cys Ser Cys Pro Arg Gly Thr Gln Gly Val His Cys
 1205 1210 1215
 Glu Ile Asn Val Asp Asp Cys Asn Pro Pro Val Asp Pro Val Ser
 1220 1225 1230
 Arg Ser Pro Lys Cys Phe Asn Asn Gly Thr Cys Val Asp Gln Val
 1235 1240 1245

Gly Gly Tyr Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Glu Arg
 1250 1255 1260
 Cys Glu Gly Asp Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Asp Ala
 1265 1270 1275
 Arg Gly Thr Gln Asn Cys Val Gln Arg Val Asn Asp Phe His Cys
 1280 1285 1290
 Glu Cys Arg Ala Gly His Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Val Ile
 1295 1300 1305
 Asn Gly Cys Lys Gly Lys Pro Cys Lys Asn Gly Gly Thr Cys Ala
 1310 1315 1320
 Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe Ile Cys Lys Cys Pro Ala
 1325 1330 1335
 Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp Ala Arg Thr Cys Gly
 1340 1345 1350
 Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile Ser Gly Pro Arg
 1355 1360 1365
 Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Pro Phe Thr Gly Pro Glu Cys
 1370 1375 1380
 Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Leu Gly Gly Asn Pro Cys Tyr
 1385 1390 1395
 Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Ser Pro Phe Tyr Arg
 1400 1405 1410
 Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu
 1415 1420 1425
 Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro
 1430 1435 1440
 Leu Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala
 1445 1450 1455
 Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly
 1460 1465 1470
 Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys
 1475 1480 1485
 Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly
 1490 1495 1500

His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly
 1505 1510 1515
 Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp
 1520 1525 1530
 Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly
 1535 1540 1545
 Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu
 1550 1555 1560
 His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val Val
 1565 1570 1575
 Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
 1580 1585 1590
 Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg
 1595 1600 1605
 Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu
 1610 1615 1620
 Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp
 1625 1630 1635
 Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu
 1640 1645 1650
 Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro
 1655 1660 1665
 Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg
 1670 1675 1680
 Gln Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp
 1685 1690 1695
 Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn
 1700 1705 1710
 Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro
 1715 1720 1725
 Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala
 1730 1735 1740
 Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg

1745	1750	1755
Lys Arg 1760	Arg Arg Gln His Gly 1765	Gln Leu Trp Phe Pro 1770
Glu Gly Phe		
Lys Val 1775	Ser Glu Ala Ser Lys 1780	Lys Lys Arg Arg Glu 1785
Pro Leu Gly		
Glu Asp 1790	Ser Val Gly Leu Lys 1795	Pro Leu Lys Asn Ala 1800
Ser Asp Gly		
Ala Leu 1805	Met Asp Asp Asn Gln 1810	Asn Glu Trp Gly Asp 1815
Glu Asp Leu		
Glu Thr 1820	Lys Lys Phe Arg Phe 1825	Glu Glu Pro Val Val 1830
Leu Pro Asp		
Leu Asp 1835	Asp Gln Thr Asp His 1840	Arg Gln Trp Thr Gln 1845
Gln His Leu		
Asp Ala 1850	Ala Asp Leu Arg Met 1855	Ser Ala Met Ala Pro 1860
Thr Pro Pro		
Gln Gly 1865	Glu Val Asp Ala Asp 1870	Cys Met Asp Val Asn 1875
Val Arg Gly		
Pro Asp 1880	Gly Phe Thr Pro Leu 1885	Met Ile Ala Ser Cys 1890
Ser Gly Gly		
Gly Leu 1895	Glu Thr Gly Asn Ser 1900	Glu Glu Glu Glu Asp 1905
Ala Pro Ala		
Val Ile 1910	Ser Asp Phe Ile Tyr 1915	Gln Gly Ala Ser Leu 1920
His Asn Gln		
Thr Asp 1925	Arg Thr Gly Glu Thr 1930	Ala Leu His Leu Ala 1935
Ala Arg Tyr		
Ser Arg 1940	Ser Asp Ala Ala Lys 1945	Arg Leu Leu Glu Ala 1950
Ser Ala Asp		
Ala Asn 1955	Ile Gln Asp Asn Met 1960	Gly Arg Thr Pro Leu 1965
His Ala Ala		
Val Ser 1970	Ala Asp Ala Gln Gly 1975	Val Phe Gln Ile Leu 1980
Ile Arg Asn		
Arg Ala 1985	Thr Asp Leu Asp Ala 1990	Arg Met His Asp Gly 1995
Thr Thr Pro		

Leu Ile 2000 Leu Ala Ala Arg Leu 2005 Ala Val Glu Gly Met 2010 Leu Glu Asp
 Leu Ile 2015 Asn Ser His Ala Asp 2020 Val Asn Ala Val Asp 2025 Asp Leu Gly
 Lys Ser 2030 Ala Leu His Trp Ala 2035 Ala Ala Val Asn Asn 2040 Val Asp Ala
 Ala Val 2045 Val Leu Leu Lys Asn 2050 Gly Ala Asn Lys Asp 2055 Met Gln Asn
 Asn Arg 2060 Glu Glu Thr Pro Leu 2065 Phe Leu Ala Ala Arg 2070 Glu Gly Ser
 Tyr Glu 2075 Thr Ala Lys Val Leu 2080 Leu Asp His Phe Ala 2085 Asn Arg Asp
 Ile Thr 2090 Asp His Met Asp Arg 2095 Leu Pro Arg Asp Ile 2100 Ala Gln Glu
 Arg Met 2105 His His Asp Ile Val 2110 Arg Leu Leu Asp Glu 2115 Tyr Asn Leu
 Val Arg 2120 Ser Pro Gln Leu His 2125 Gly Ala Pro Leu Gly 2130 Gly Thr Pro
 Thr Leu 2135 Ser Pro Pro Leu Cys 2140 Ser Pro Asn Gly Tyr 2145 Leu Gly Ser
 Leu Lys 2150 Pro Gly Val Gln Gly 2155 Lys Lys Val Arg Lys 2160 Pro Ser Ser
 Lys Gly 2165 Leu Ala Cys Gly Ser 2170 Lys Glu Ala Lys Asp 2175 Leu Lys Ala
 Arg Arg 2180 Lys Lys Ser Gln Asp 2185 Gly Lys Gly Cys Leu 2190 Leu Asp Ser
 Ser Gly 2195 Met Leu Ser Pro Val 2200 Asp Ser Leu Glu Ser 2205 Pro His Gly
 Tyr Leu 2210 Ser Asp Val Ala Ser 2215 Pro Pro Leu Leu Pro 2220 Ser Pro Phe
 Gln Gln 2225 Ser Pro Ser Val Pro 2230 Leu Asn His Leu Pro 2235 Gly Met Pro
 Asp Thr 2240 His Leu Gly Ile Gly 2245 His Leu Asn Val Ala 2250 Ala Lys Pro

Glu Met Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ala Phe Glu Thr
 2255 2260 2265
 Gly Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val Ala Ser Gly Thr Ser
 2270 2275 2280
 Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ala Leu Asn Phe Thr Val
 2285 2290 2295
 Gly Gly Ser Thr Ser Leu Asn Gly Gln Cys Glu Trp Leu Ser Arg
 2300 2305 2310
 Leu Gln Ser Gly Met Val Pro Asn Gln Tyr Asn Pro Leu Arg Gly
 2315 2320 2325
 Ser Val Ala Pro Gly Pro Leu Ser Thr Gln Ala Pro Ser Leu Gln
 2330 2335 2340
 His Gly Met Val Gly Pro Leu His Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ala
 2345 2350 2355
 Leu Ser Gln Met Met Ser Tyr Gln Gly Leu Pro Ser Thr Arg Leu
 2360 2365 2370
 Ala Thr Gln Pro His Leu Val Gln Thr Gln Gln Val Gln Pro Gln
 2375 2380 2385
 Asn Leu Gln Met Gln Gln Gln Asn Leu Gln Pro Ala Asn Ile Gln
 2390 2395 2400
 Gln Gln Gln Ser Leu Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro His
 2405 2410 2415
 Leu Gly Val Ser Ser Ala Ala Ser Gly His Leu Gly Arg Ser Phe
 2420 2425 2430
 Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val Gln Pro Leu Gly Pro
 2435 2440 2445
 Ser Ser Leu Ala Val His Thr Ile Leu Pro Gln Glu Ser Pro Ala
 2450 2455 2460
 Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Pro Val Thr Ala
 2465 2470 2475
 Ala Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His Ser Tyr Ser Ser Pro
 2480 2485 2490
 Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu Gln Val Pro Glu His Pro
 2495 2500 2505
 Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser
 2510 2515 2520
 Ser Pro His Ser Asn Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly Val Ser Ser
 2525 2530 2535
 Pro Pro Thr Ser Met Gln Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu Ala
 2540 2545 2550
 Phe Lys
 2555

<210> 57

<211> 2531

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 57

```

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

```

Gln Asp Val Asn Glu Cys Ser Gln Asn Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
 180 185 190
 Gly Thr Cys His Asn Glu Ile Gly Ser Tyr Arg Cys Ala Cys Arg Ala
 195 200 205
 Thr His Thr Gly Pro His Cys Glu Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro
 210 215 220
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Thr Thr
 225 230 235 240
 His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Gln Asn Cys Glu Glu
 245 250 255
 Asn Val Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys
 260 265 270
 Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr
 275 280 285
 Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn
 290 295 300
 Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn
 305 310 315 320
 Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile
 325 330 335
 Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe Gln Gly Ala Thr Cys His Asp
 340 345 350
 Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu
 355 360 365
 Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly
 370 375 380
 Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys
 385 390 395 400
 Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
 405 410 415
 Ala Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Leu Asn Thr
 420 425 430
 Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg

435	440	445
Cys Glu Ile Asp Val Asn 450	Glu Cys Ile Ser Asn 455	Pro Cys Gln Asn Asp 460
Ala Thr Cys Leu Asp Gln 465	Ile Gly Glu Phe Gln 470	Cys Ile Cys Met Pro 475
Gly Tyr Glu Gly Val Tyr 485	Cys Glu Ile Asn Thr 490	Asp Glu Cys Ala Ser 495
Ser Pro Cys Leu His Asn 500	Gly His Cys Met Asp 505	Lys Ile Asn Glu Phe 510
Gln Cys Gln Cys Pro Lys 515	Gly Phe Asn Gly His 520	Leu Cys Gln Tyr Asp 525
Val Asp Glu Cys Ala Ser 530	Thr Pro Cys Lys Asn 535	Gly Ala Lys Cys Leu 540
Asp Gly Pro Asn Thr Tyr 545	Thr Cys Val Cys Thr 550	Glu Gly Tyr Thr Gly 555
Thr His Cys Glu Val Asp 565	Ile Asp Glu Cys Asp 570	Pro Asp Pro Cys His 575
Tyr Gly Ser Cys Lys Asp 580	Gly Val Ala Thr 585	Phe Thr Cys Leu Cys 590
Pro Gly Tyr Thr Gly His 595	His Cys Glu Thr Asn 600	Ile Asn Glu Cys His 605
Ser Gln Pro Cys Arg His 610	Gly Gly Thr Cys Gln 615	Asp Arg Asp Asn Ser 620
Tyr Leu Cys Leu Cys Leu 625	Lys Gly Thr Thr Gly 630	Pro Asn Cys Glu Ile 635
Asn Leu Asp Asp Cys Ala 645	Ser Asn Pro Cys Asp 650	Ser Gly Thr Cys Leu 655
Asp Lys Ile Asp Gly Tyr 660	Glu Cys Ala Cys Glu 665	Pro Gly Tyr Thr Gly 670
Ser Met Cys Asn Val Asn 675	Ile Asp Glu Cys Ala 680	Gly Ser Pro Cys His 685
Asn Gly Gly Thr Cys Glu 690	Asp Gly Ile Ala Gly 695	Phe Thr Cys Arg Cys 700

Pro Glu Gly Tyr His Asp Pro Thr Cys Leu Ser Glu Val Asn Glu Cys
 705 710 715 720
 Asn Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Ala Cys Arg Asp Gly Leu Asn Gly
 725 730 735
 Tyr Lys Cys Asp Cys Ala Pro Gly Trp Ser Gly Thr Asn Cys Asp Ile
 740 745 750
 Asn Asn Asn Glu Cys Glu Ser Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys
 755 760 765
 Lys Asp Met Thr Ser Gly Tyr Val Cys Thr Cys Arg Glu Gly Phe Ser
 770 775 780
 Gly Pro Asn Cys Gln Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys
 785 790 795 800
 Leu Asn Gln Gly Thr Cys Ile Asp Asp Val Ala Gly Tyr Lys Cys Asn
 805 810 815
 Cys Pro Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Cys Glu Val Val Leu Ala Pro
 820 825 830
 Cys Ala Thr Ser Pro Cys Lys Asn Ser Gly Val Cys Lys Glu Ser Glu
 835 840 845
 Asp Tyr Glu Ser Phe Ser Cys Val Cys Pro Thr Gly Trp Gln Gly Gln
 850 855 860
 Thr Cys Glu Val Asp Ile Asn Glu Cys Val Lys Ser Pro Cys Arg His
 865 870 875 880
 Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Gln
 885 890 895
 Ala Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Glu Ser Asp Ile Asp Asp Cys Arg
 900 905 910
 Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Gly Ile Asn Thr
 915 920 925
 Ala Phe Cys Asp Cys Leu Pro Gly Phe Gln Gly Ala Phe Cys Glu Glu
 930 935 940
 Asp Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala Asn Cys
 945 950 955 960
 Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Val Gly Phe Asn
 965 970 975

Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys
 980 985 990

Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu
 995 1000 1005

Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln Tyr Asp Val Asn
 1010 1015 1020

Glu Cys Asp Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp
 1025 1030 1035

Ser Tyr Gly Thr Tyr Lys Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly
 1040 1045 1050

Leu Asn Cys Gln Asn Leu Val Arg Trp Cys Asp Ser Ala Pro Cys
 1055 1060 1065

Lys Asn Gly Gly Arg Cys Trp Gln Thr Asn Thr Gln Tyr His Cys
 1070 1075 1080

Glu Cys Arg Ser Gly Trp Thr Gly Val Asn Cys Asp Val Leu Ser
 1085 1090 1095

Val Ser Cys Glu Val Ala Ala Gln Lys Arg Gly Ile Asp Val Thr
 1100 1105 1110

Leu Leu Cys Gln His Gly Gly Leu Cys Val Asp Glu Gly Asp Lys
 1115 1120 1125

His Tyr Cys His Cys Gln Ala Gly Tyr Thr Gly Ser Tyr Cys Glu
 1130 1135 1140

Asp Glu Val Asp Glu Cys Ser Pro Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala
 1145 1150 1155

Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Phe Ser Cys Lys Cys Val Ala
 1160 1165 1170

Gly Tyr His Gly Ser Asn Cys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Cys Leu
 1175 1180 1185

Ser Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ile Asp Leu Thr Asn
 1190 1195 1200

Ser Tyr Lys Cys Ser Cys Pro Arg Gly Thr Gln Gly Val His Cys
 1205 1210 1215

Glu Ile Asn Val Asp Asp Cys His Pro Pro Leu Asp Pro Ala Ser
 1220 1225 1230

Arg Ser Pro Lys Cys Phe Asn Asn Gly Thr Cys Val Asp Gln Val
 1235 1240 1245
 Gly Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Glu Arg
 1250 1255 1260
 Cys Glu Gly Asp Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Asp Pro
 1265 1270 1275
 Arg Gly Thr Gln Asn Cys Val Gln Arg Val Asn Asp Phe His Cys
 1280 1285 1290
 Glu Cys Arg Ala Gly His Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Val Ile
 1295 1300 1305
 Asn Gly Cys Arg Gly Lys Pro Cys Lys Asn Gly Gly Val Cys Ala
 1310 1315 1320
 Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe Ile Cys Arg Cys Pro Ala
 1325 1330 1335
 Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp Ala Arg Thr Cys Gly
 1340 1345 1350
 Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile Ser Gly Pro Arg
 1355 1360 1365
 Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Ser Phe Thr Gly Pro Glu Cys
 1370 1375 1380
 Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Val Gly Ser Asn Pro Cys Tyr
 1385 1390 1395
 Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Asn Pro Phe Tyr Arg
 1400 1405 1410
 Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu
 1415 1420 1425
 Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro
 1430 1435 1440
 Gln Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala
 1445 1450 1455
 Gly Asn Lys Val Cys Asn Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly
 1460 1465 1470
 Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys

1475	1480	1485
Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln 1490	Cys Trp Lys Tyr Phe 1495	Ser Asp Gly 1500
His Cys Asp Ser Gln Cys Asn 1505	Ser Ala Gly Cys Leu 1510	Phe Asp Gly 1515
Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu 1520	Gly Gln Cys Asn Pro 1525	Leu Tyr Asp 1530
Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe 1535	Ser Asp Gly His Cys 1540	Asp Gln Gly 1545
Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu 1550	Trp Asp Gly Leu Asp 1555	Cys Ala Glu 1560
His Val Pro Glu Arg Leu Ala 1565	Ala Gly Thr Leu Val 1570	Leu Val Val 1575
Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu 1580	Arg Asn Asn Ser Phe 1585	His Phe Leu 1590
Arg Glu Leu Ser His Val Leu 1595	His Thr Asn Val Val 1600	Phe Lys Arg 1605
Asp Ala Gln Gly Gln Gln Met 1610	Ile Phe Pro Tyr Tyr 1615	Gly His Glu 1620
Glu Glu Leu Arg Lys His Pro 1625	Ile Lys Arg Ser Thr 1630	Val Gly Trp 1635
Ala Thr Ser Ser Leu Leu Pro 1640	Gly Thr Ser Gly Gly 1645	Arg Gln Arg 1650
Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp 1655	Ile Arg Gly Ser Ile 1660	Val Tyr Leu 1665
Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys 1670	Val Gln Ser Ser Ser 1675	Gln Cys Phe 1680
Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala 1685	Ala Phe Leu Gly Ala 1690	Leu Ala Ser 1695
Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro 1700	Tyr Lys Ile Glu Ala 1705	Val Lys Ser 1710
Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu 1715	Pro Ser Gln Leu His 1720	Leu Met Tyr 1725

Val Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly
 1730 1735 1740
 Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp
 1745 1750 1755
 Phe Pro Glu Gly Phe Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg
 1760 1765 1770
 Arg Glu Pro Leu Gly Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys
 1775 1780 1785
 Asn Ala Ser Asp Gly Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp
 1790 1795 1800
 Gly Asp Glu Asp Leu Glu Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro
 1805 1810 1815
 Val Val Leu Pro Asp Leu Ser Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp
 1820 1825 1830
 Thr Gln Gln His Leu Asp Ala Ala Asp Leu Arg Met Ser Ala Met
 1835 1840 1845
 Ala Pro Thr Pro Pro Gln Gly Glu Val Asp Ala Asp Cys Met Asp
 1850 1855 1860
 Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Phe Thr Pro Leu Met Ile Ala
 1865 1870 1875
 Ser Cys Ser Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Asn Ser Glu Glu Glu
 1880 1885 1890
 Glu Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr Gln Gly Ala
 1895 1900 1905
 Ser Leu His Asn Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala Leu His
 1910 1915 1920
 Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu
 1925 1930 1935
 Glu Ala Ser Ala Asp Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr
 1940 1945 1950
 Pro Leu His Ala Ala Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln
 1955 1960 1965
 Ile Leu Leu Arg Asn Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His
 1970 1975 1980

Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu
 1985 1990 1995
 Gly Met Leu Glu Asp Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala
 2000 2005 2010
 Val Asp Asp Leu Gly Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val
 2015 2020 2025
 Asn Asn Val Asp Ala Ala Val Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn
 2030 2035 2040
 Lys Asp Met Gln Asn Asn Lys Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala
 2045 2050 2055
 Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu Thr Ala Lys Val Leu Leu Asp His
 2060 2065 2070
 Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His Met Asp Arg Leu Pro Arg
 2075 2080 2085
 Asp Ile Ala Gln Glu Arg Met His His Asp Ile Val Arg Leu Leu
 2090 2095 2100
 Asp Glu Tyr Asn Leu Val Arg Ser Pro Gln Leu His Gly Thr Ala
 2105 2110 2115
 Leu Gly Gly Thr Pro Thr Leu Ser Pro Thr Leu Cys Ser Pro Asn
 2120 2125 2130
 Gly Tyr Leu Gly Asn Leu Lys Ser Ala Thr Gln Gly Lys Lys Ala
 2135 2140 2145
 Arg Lys Pro Ser Thr Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser Lys Glu Ala
 2150 2155 2160
 Lys Asp Leu Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ser Gln Asp Gly Lys Gly
 2165 2170 2175
 Cys Leu Leu Asp Ser Ser Ser Met Leu Ser Pro Val Asp Ser Leu
 2180 2185 2190
 Glu Ser Pro His Gly Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser Pro Pro Leu
 2195 2200 2205
 Leu Pro Ser Pro Phe Gln Gln Ser Pro Ser Met Pro Leu Ser His
 2210 2215 2220
 Leu Pro Gly Met Pro Asp Thr His Leu Gly Ile Ser His Leu Asn
 2225 2230 2235

Val Ala 2240 Ala Lys Pro Glu Met 2245 Ala Ala Leu Ala Gly 2250 Gly Ser Arg
 Leu Ala 2255 Phe Glu Pro Pro Pro 2260 Pro Arg Leu Ser His 2265 Leu Pro Val
 Ala Ser 2270 Ser Ala Ser Thr Val 2275 Leu Ser Thr Asn Gly 2280 Thr Gly Ala
 Met Asn 2285 Phe Thr Val Gly Ala 2290 Pro Ala Ser Leu Asn 2295 Gly Gln Cys
 Glu Trp 2300 Leu Pro Arg Leu Gln 2305 Asn Gly Met Val Pro 2310 Ser Gln Tyr
 Asn Pro 2315 Leu Arg Pro Gly Val 2320 Thr Pro Gly Thr Leu 2325 Ser Thr Gln
 Ala Ala 2330 Gly Leu Gln His Ser 2335 Met Met Gly Pro Leu 2340 His Ser Ser
 Leu Ser 2345 Thr Asn Thr Leu Ser 2350 Pro Ile Ile Tyr Gln 2355 Gly Leu Pro
 Asn Thr 2360 Arg Leu Ala Thr Gln 2365 Pro His Leu Val Gln 2370 Thr Gln Gln
 Val Gln 2375 Pro Gln Asn Leu Gln 2380 Leu Gln Pro Gln Asn 2385 Leu Gln Pro
 Pro Ser 2390 Gln Pro His Leu Ser 2395 Val Ser Ser Ala Ala 2400 Asn Gly His
 Leu Gly 2405 Arg Ser Phe Leu Ser 2410 Gly Glu Pro Ser Gln 2415 Ala Asp Val
 Gln Pro 2420 Leu Gly Pro Ser Ser 2425 Leu Pro Val His Thr 2430 Ile Leu Pro
 Gln Glu 2435 Ser Gln Ala Leu Pro 2440 Thr Ser Leu Pro Ser 2445 Ser Met Val
 Pro Pro 2450 Met Thr Thr Thr Gln 2455 Phe Leu Thr Pro Pro 2460 Ser Gln His
 Ser Tyr 2465 Ser Ser Ser Pro Val 2470 Asp Asn Thr Pro Ser 2475 His Gln Leu
 Gln Val 2480 Pro Glu His Pro Phe 2485 Leu Thr Pro Ser Pro 2490 Glu Ser Pro
 Asp Gln 2495 Trp Ser Ser Ser Ser 2500 Pro His Ser Asn Ile 2505 Ser Asp Trp
 Ser Glu 2510 Gly Ile Ser Ser Pro 2515 Pro Thr Thr Met Pro 2520 Ser Gln Ile
 Thr His 2525 Ile Pro Glu Ala Phe 2530 Lys

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 58

Glu Val Gln Leu val Glu Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Asn Pro Ser Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu val Thr val Ser Ser
 115

<210> 59

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 60

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Gly Ser Ala His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

<210> 61
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Arg Ser Asn Gln Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 63

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 63

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Tyr Thr Thr Pro Ser
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 64
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 64
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Asn Pro Ala Asn Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 65
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 65
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

Lisboa, 2013-11-08

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-região reguladora negativa de Notch1 (NRR) isolado, em que o referido anticorpo, quando ligado à referida NRR de Notch1, diminui a sinalização de Notch1, e em que a referida NRR de Notch1 é uma NRR de Notch1 humana possuindo a sequência de aminoácidos mostrada como aminoácidos 1446 a 1735 de SEQ ID NO:56 ou uma NRR de Notch1 de ratinho possuindo a sequência de aminoácidos mostrada como aminoácidos 1446 a 1725 de SEQ ID NO:57.

2. Anticorpo anti-NRR de Notch1 isolado da reivindicação 1, em que o referido anticorpo se liga à NRR de Notch1 humana e à NRR de Notch1 de ratinho.

3. Anticorpo anti-NRR de Notch1 isolado da reivindicação 1 ou 2, em que o referido anticorpo se liga à NRR de Notch1 com uma Kd de 1×10^{-7} ou mais forte.

4. Anticorpo anti-NRR de Notch1 isolado da reivindicação 1 ou 2, em que a referida ligação é com (i) uma Kd de 1×10^{-8} ou mais forte, ou (ii) uma Kd de 1×10^{-9} ou mais forte.

5. Anticorpo anti-NRR de Notch1 isolado de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 compreendendo:

(a) pelo menos uma, duas, três, quatro ou cinco sequências de regiões hipervariáveis (HVR) seleccionadas a partir do grupo que consiste em:

(i) HVR-L1 compreendendo a sequência A1-A11, em que A1-A11 é RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:7)

(ii) HVR-L2 compreendendo a sequência B1-B7, em que B1-B7 é SASFLYS (SEQ ID NO:8)

(iii) HVR-L3 compreendendo a sequência C1-C9, em que C1-C9 é QQSYTTPPT (SEQ ID NO:9)

(iv) HVR-H1 compreendendo a sequência D1-D10, em que D1-D10 é GFTFSSYWIH (SEQ ID NO:1)

(v) HVR-H2 compreendendo a sequência E1-E18, em que E1-E18 é ARINPSNGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:2) e

(vi) HVR-H3 compreendendo a sequência F1-F14, em que F1-F14 é ARGSGFRWMDY (SEQ ID NO:6); e

(b) pelo menos uma HVR variante, em que a sequência de HVR variante compreende a substituição de pelo menos um resíduo da sequência representada em SEQ ID NOS:1-12.

6. Anticorpo da reivindicação 5, em que uma variante de HVR-L3 compreende 1, 2, 3, ou 4 substituições em qualquer combinação das seguintes posições: C3, C4, C5, e C8, em que C3 é S ou F, C4 é Y ou F, C5 é T ou S, e C8 é P ou A ou S; ou em que uma variante de HVR-H2 compreende 1, 2, 3 ou 4 substituições em qualquer combinação das seguintes posições: E6, E8, E10, e E11, em que E6 é S ou P ou A, E8 é G ou R, E10 é T ou A ou N, e E11 é N ou H ou Q ou R.

7. Anticorpo anti-NRR de Notch1 isolado de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o anticorpo compreende pelo menos uma, pelo menos duas, pelo menos três, ou todas as quatro das seguintes:

(i) uma sequência de HVR-H1 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:1;

(ii) uma sequência de HVR-H2 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:2, 3, 4, ou 5;

(iii) uma sequência de HVR-H3 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:6; e

(iv) uma sequência de HVR-L3 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:10, 11 ou 12.

8. Anticorpo da reivindicação 7, em que o anticorpo compreende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, e HVR-H3, em que cada um, por ordem, compreende:

(i) SEQ ID NO:7, 8, 9, 1, 2, 6;

(ii) SEQ ID NO:7, 8, 10, 1, 3, 6;

(iii) SEQ ID NO:7, 8, 11, 1, 4, 6; ou

(iv) SEQ ID NO:7, 8, 12, 1, 5, 6.

9. Anticorpo que (i) compete com um anticorpo da reivindicação 8 pela ligação a NRR de Notch1, ou (ii) se liga ao mesmo epitopo na NRR de Notch1 que um anticorpo da reivindicação 8.

10. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 5-8 em que o anticorpo compreende (i) uma sequência de estrutura, em que pelo menos uma porção da sequência de estrutura é uma

sequência de estrutura de consenso humana, (ii) uma sequência de estrutura de consenso subgrupo κ humana, ou (iii) uma sequência de estrutura de consenso da cadeia pesada subgrupo III humana.

11. Anticorpo da reivindicação 10 (iii), em que o anticorpo compreende uma substituição numa ou mais das posições 71, 73, ou 78, e em que, opcionalmente, a substituição é uma ou mais de R71A, N73T, ou N78A.

12. Polinucleótido codificando um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-11.

13. Vector compreendendo o polinucleótido da reivindicação 12, em que, opcionalmente, o vector é um vector de expressão.

14. Célula hospedeira compreendendo um vector da reivindicação 13, em que, opcionalmente, a célula hospedeira é procariótica, eucariótica, ou de mamífero.

15. Método para produção de um anticorpo anti-NRR de Notch1, o referido método compreendendo (a) a expressão de um vector de expressão da reivindicação 13 numa célula hospedeira adequada, e (b) a recuperação do anticorpo.

16. Anticorpo anti-NRR de Notch1 de qualquer uma das reivindicações 1-11 para utilização num método de tratamento.

17. Anticorpo anti-NRR de Notch1 de qualquer uma das reivindicações 1-11 para utilização num método para tratamento de um indivíduo possuindo um distúrbio associado a sinalização de Notch1 aumentada, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do referido anticorpo anti-NRR de Notch1 ao indivíduo, em que o referido distúrbio (i) é um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular, (ii) é um distúrbio neurodegenerativo, ou (iii) compreende uma condição patológica associada a angiogénese que é uma doença neovascular intraocular.

18. Anticorpo anti-NRR de Notch1 para utilização de acordo com a reivindicação 17, em que o distúrbio é um

cancro, tumor, e/ou distúrbio proliferativo celular seleccionado a partir do grupo que consiste em cancro colorrectal, cancro gastrointestinal, cancro do pulmão, cancro da mama, cancro do ovário, leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) e melanoma.

19. Anticorpo anti-NRR de Notch1 para utilização de acordo com a reivindicação 18, em que o distúrbio é adenocarcinoma ou adenoma do cólon, cancro do pulmão de células não pequenas, cancro do ovário, ou carcinoma da mama.

20. Anticorpo anti-NRR de Notch1 para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-19, o método compreendendo ainda a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um segundo medicamento, em que o anticorpo anti-NRR de Notch1 é um primeiro medicamento.

21. Anticorpo anti-NRR de Notch1 para utilização de acordo com a reivindicação 20, em que o segundo medicamento é (i) outro anticorpo, um agente quimioterapêutico, um agente citotóxico, um agente anti-angiogénico, um agente imunossupressor, um pró-fármaco, uma citocina, um antagonista de citocina, radioterapia citotóxica, um corticosteróide, um antiemético, uma vacina de cancro, um analgésico, ou um agente inibidor do crescimento, ou (ii) tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib ou trastuzumab.

22. Anticorpo anti-NRR de Notch1 para utilização de acordo com a reivindicação 20 ou 21, em que o segundo medicamento é administrado antes ou subsequentemente à administração do anticorpo anti-NRR de Notch1, ou em simultâneo com o anticorpo anti-NRR de Notch1.

23. Anticorpo anti-NRR de Notch1 para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-22, em que o referido indivíduo é um ser humano.

24. Anticorpo anti-NRR de Notch1 para utilização de acordo com a reivindicação 17, em que o distúrbio está

associado a uma mutação de activação numa sequência de aminoácidos de Notch1.

25. Composição compreendendo um anticorpo anti-NRR de Notch1 tal como em qualquer uma das reivindicações 1-11 e um transportador farmacêutico.

Lisboa, 2013-11-08

CLONE #	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
ANTICORPO A	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H
ANTICORPO A-1	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H
ANTICORPO A-2	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H
ANTICORPO A-3	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H

CLONE #	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
ANTICORPO A	A	R	I	N	P	S	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
ANTICORPO A-1	A	R	I	N	P	P	N	G	S	A	H	Y	A	D	S	V	K	G
ANTICORPO A-2	A	R	I	N	P	P	N	R	S	N	Q	Y	A	D	S	V	K	G
ANTICORPO A-3	A	R	I	N	P	A	N	G	S	T	R	Y	A	D	S	V	K	G

CLONE #	H3													
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	101	102		
ANTICORPO A	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y		
ANTICORPO A-1	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y		
ANTICORPO A-2	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y		
ANTICORPO A-3	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y		

Fig. 1-1

CLONE #	L1											
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
ANTICORPO A	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
ANTICORPO A-1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
ANTICORPO A-2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
ANTICORPO A-3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	

CLONE #	L2							
	50	51	52	53	54	55	56	
ANTICORPO A	S	A	S	F	L	Y	S	
ANTICORPO A-1	S	A	S	F	L	Y	S	
ANTICORPO A-2	S	A	S	F	L	Y	S	
ANTICORPO A-3	S	A	S	F	L	Y	S	

CLONE #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
ANTICORPO A	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
ANTICORPO A-1	Q	Q	S	Y	T	T	P	A	T
ANTICORPO A-2	Q	Q	F	Y	T	T	P	S	T
ANTICORPO A-3	Q	Q	S	F	S	T	P	A	T

Fig. 1-2

FIGURA 2

Anticorpo A

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWV
ARINPSNGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO:58)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:59)

Anticorpo A-1

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPPNGSAH
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:60)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:61)

Anticorpo A-2

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPPNRSNQ
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:62)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFYTTPSTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:63)

Anticorpo A-3

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPANGSTR
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:64)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSFSTPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:65)

I	A	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWVG	-H2-
	B	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWVG	-H2-
	C	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWVG	-H2-
	D	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWVG	-H2-
II	A	QVQLQESGGPGLVKPPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLLEWIG	-H2-
	B	QVQLQESGGPGLVKPPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLLEWIG	-H2-
	C	QVQLQESGGPGLVKPPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLLEWIG	-H2-
	D	QVQLQESGGPGLVKPPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLLEWIG	-H2-
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
Aceitador					
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
Segundo Aceitador					
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLLEWVS	-H2-

Fig. 3A

I	RVTITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:19
	RVTITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:20
	RVTITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:21
	RVTITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:22
II	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:23
	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:24
	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:25
	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:26
III	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:27
	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:28
	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:29
	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:30
Aceitador	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:31
	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:32
	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:33
Segundo Aceitador	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:34
	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:35
	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:36
	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO:37

Fig. 3B

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC-LI-WYQQKPGKAPKLLIY
kv2 DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC-LI-WYLQKPGQSPQLLIY
kv3 EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC-LI-WYQQKPGQAPRLLIY
kv4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC-LI-WYQQKPGQPPKLLIY

kvl	-I2-GVPSRFSGSGS	GTDFTLT	ISSLQPE	DFA	TYYC-L3-F	GQG	TKE	V E I K	SEQ ID NO:38
kvl	-I2-GVPDRFSGSGS	GTDFTLT	KISRVEA	EDVG	VYYC-L3-F	GQG	TKE	V E I K	SEQ ID NO:39
kvl	-I2-GIPDRFSGSGS	GTDFTLT	ISRLEP	EDFA	VYYC-L3-F	GQG	TKE	V E I K	SEQ ID NO:40
kvl	-I2-GVPDRFSGSGS	GTDFTLT	ISSLQA	EDVA	VYYC-L3-F	GQG	TKE	V E I K	SEQ ID NO:41

Fig. 4

SEQUÊNCIAS ESTRUTURAIS DE CADEIA LEVE DE huMAB4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO:15)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO:16)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO:17)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:18)

SEQUÊNCIAS ESTRUTURAIS DE CADEIA PESADA DE huMAB4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO:42)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO:43)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO:44)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO:45)

Fig. 5

**SEQUÊNCIAS ESTRUTURAIS DE CADEIA LEVE DE huMAb4D5-8 MODIFICADAS NA POSIÇÃO 66
(SUBLINHADO)**

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO:15)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO:16)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO:46)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:18)

**SEQUÊNCIAS ESTRUTURAIS DE CADEIA PESADA DE huMAb4D5-8 MODIFICADAS NAS POSIÇÕES
71, 73 E 78 (SUBLINHADO)**

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO:42)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO:43)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO:47)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO:45)

Fig. 6

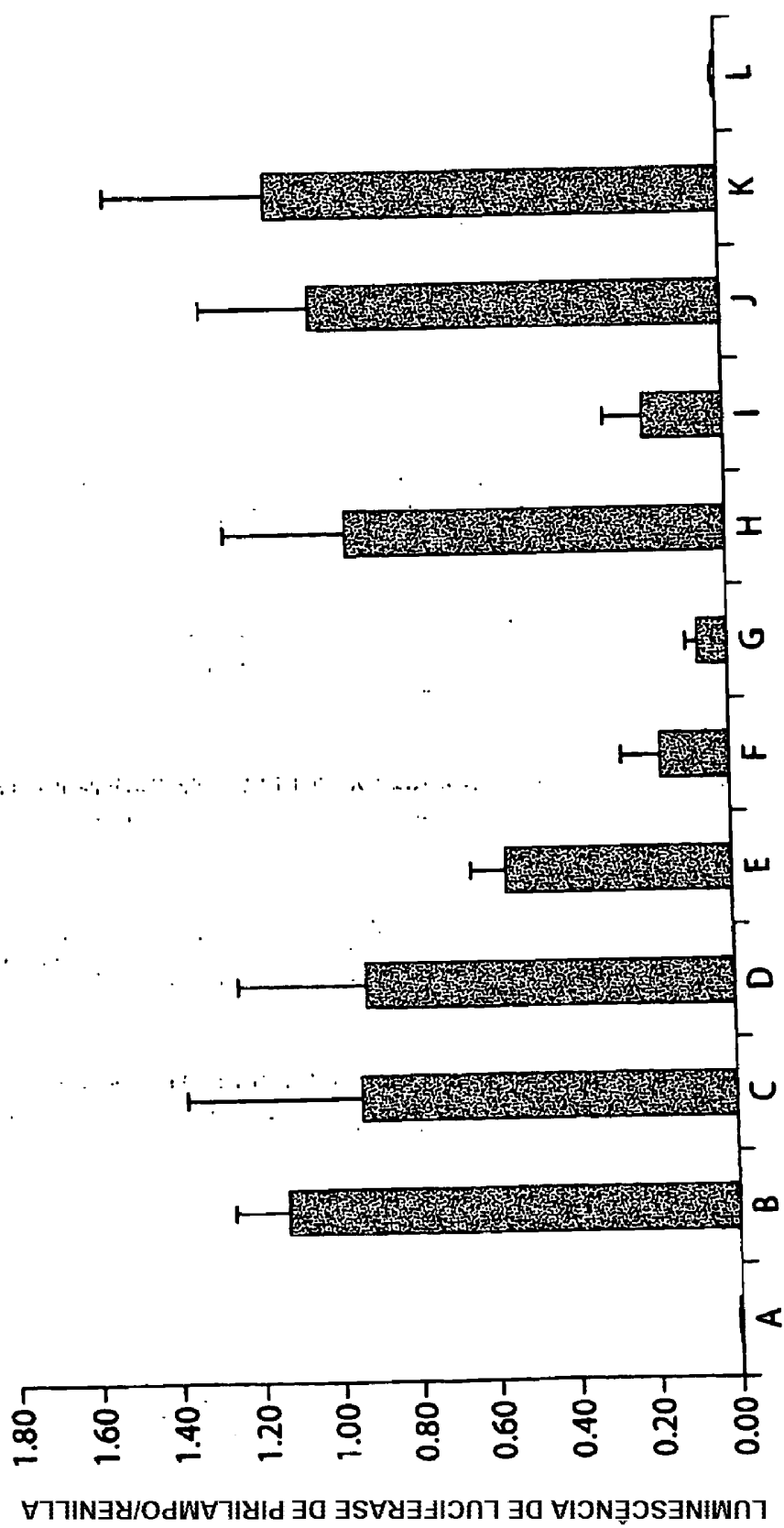
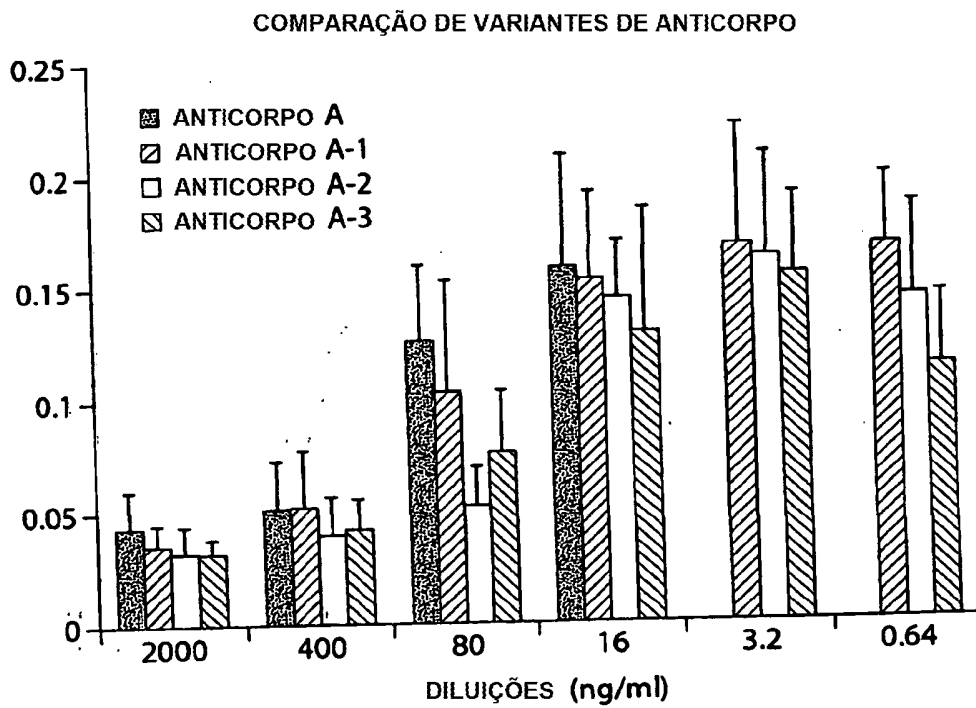
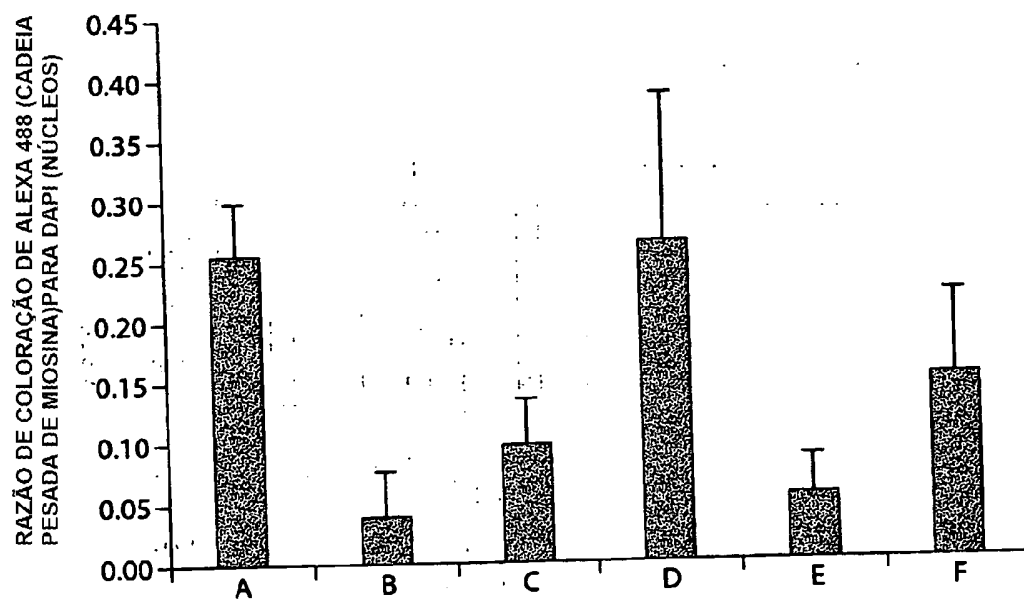
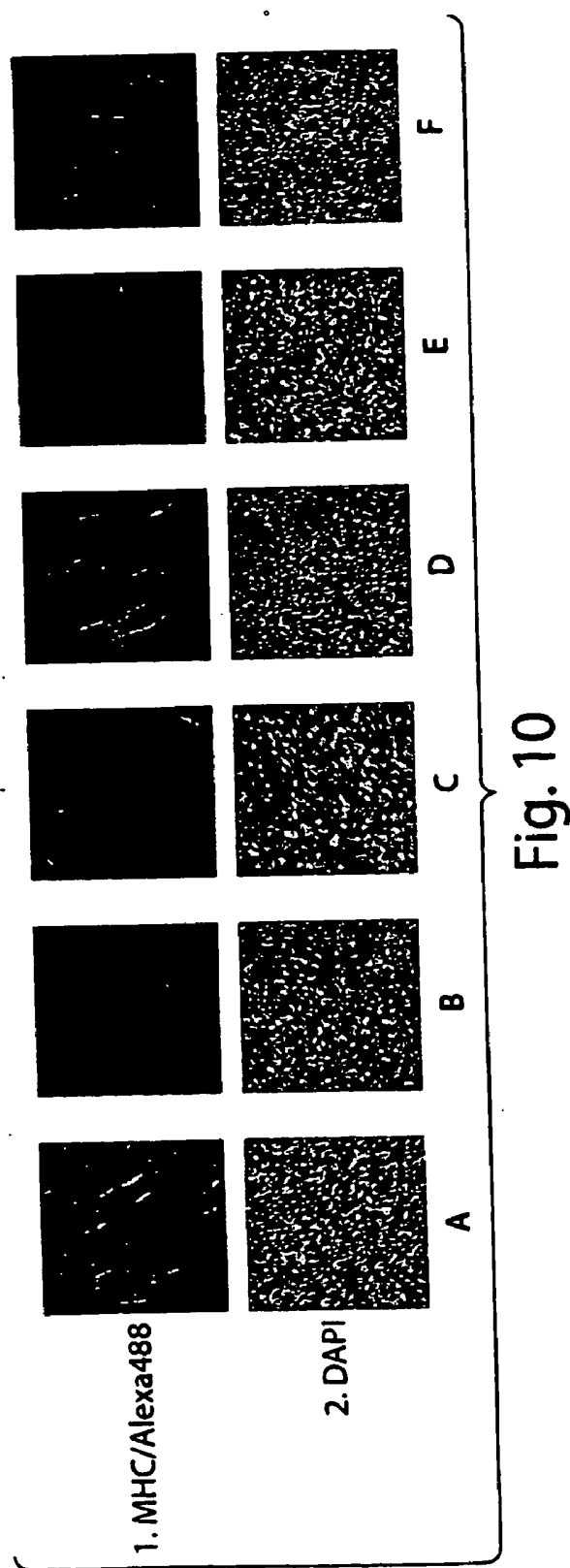


Fig. 7

**Fig. 8****Fig. 9**



90,7% de identidade em sobreposição de 2556 resíduos; Valor: 13215.0; Freqência do intervalo: 1,0%

Humano	1	MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPQCQDP
Ratinho	1	MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLRCSQPSGTCLNGGRCEVASGTEACVCSGAFVGQRQDS

		Péptido Sinal EGF1
Humano	61	NPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCRNGGTCDLL
Ratinho	61	NPCLSTPCKNAGTCHVVDHGGTVDYACSCPLGFSGPLCLTPLDNACLANPCRNGGTCDLL

		EGF2 EGF3
Humano	121	TLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLPFESSYICRCPGFGHPTCRQDVN
Ratinho	121	TLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLPFESSYICRCPGFGHPTCRQDVN

		EGF4
Humano	181	ECGQKPGLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHGTGNPCERPYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDTV
Ratinho	181	ECSQNPGLCRHGGTCHNEIGSYRCACRATHGTGPHCELPIVPCSPSPCQNGGTCRPTGDTV

		EGF5 EGF6
Humano	241	HECACLPGFQTGQNCENIDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPPEWTGQYCTEDVDECQ
Ratinho	241	HECACLPGFAGQNCENVDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPPEWTGQYCTEDVDECQ

		EGF7 EGF8
Humano	301	LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAACFHGATCHDRVASFYCE
Ratinho	301	LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAACFQGATCHDRVASFYCE

		EGF9
Humano	361	CPHGRTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVDECSLGA
Ratinho	361	CPHGRTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVDECALGA

		EGF10 EGF11
Humano	421	NPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCICMP
Ratinho	421	NPCEHAGKCLNTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECISNPCQNDATCLDQIGEFQCICMP

		EGF12
Humano	481	GYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLCOYDVDECASTPCKNG
Ratinho	481	GYEGVYCEINTDECASSPCLHNGHCMDKINEFQCQCPKGFNGHLCOYDVDECASTPCKNG

		EGF13 EGF14
Humano	541	AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPCHYGSKDGVATFTCLCRPGYTGHEC
Ratinho	541	AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPCHYGSKDGVATFTCLCQPGYTGHEC

		EGF15
Humano	601	ETNINECSSQPCRHHGTCQDRDNAYLCFCLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKID
Ratinho	601	ETNINECHSQPCRHHGTCQDRDNSYLCCLCLKGTGPNCEINLDDCASNPDCDSGTCLDKID

		EGF16 EGF17

Fig. 11-1

Humano	661	GYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEGTINGFTCRCPEGYHDPCLSEVNEC	
Ratinho	661	GYECACEPGYTGSMCNVNIDECAGSPCHNGGTCEGDIAGFTCRCPEGYHDPCLSEVNEC	
		*****	*****
		EGF18	EGF19
Humano	721	NSNPCVHGACRDSLNGYKCDGPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCR	
Ratinho	721	NSNPCIHGACRDGLNGYKCDGPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCR	
		*****	*****
		EGF20	
Humano	781	EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRN	
Ratinho	781	EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCATSPCKN	
		*****	*****
		EGF21	EGF22
Humano	841	GGECRQSEDYESFSCVCPGTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYS	
Ratinho	841	SGVCKESEDYESFSCVCPGTGWQGTCEVDINECVKSPCRHGASCQNTNGSYRCLCQAGYT	
		* * *	* * *
		EGF23	
Humano	901	GRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCTDGINAFCDCLPGFRGTFCEEDINECASDPCRNGANC	
Ratinho	901	GRNCESDIDDCRPNPCHNGGSCTDGINAFCDCLPGFQGAFCCEEDINECASNPQNGANC	
		*****	*****
		EGF24	EGF25
Humano	961	TDCVDSYTCTCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQH	
Ratinho	961	TDCVDSYTCTCPVGENGIIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQY	
		*****	*****
		EGF26	
Humano	1021	DVNECDSQPCLHGGTCQDGGCSYRCTCPQGYTGPNQNLVHWCDSPPCKNGGKCWQHTQ	
Ratinho	1021	DVNECDSRPCLHGGTCQDSYGYKCTCPQGYTGLNCQNLVRWCDSAPCKNGGRCWQHTQ	
		*****	*****
		EGF27	EGF28
Humano	1081	YRCECPSGWTGLYCDVPSVSCEVAAQRQGV DVARLCQHGGLCVDAGNTHHCRCQAGYTGS	
Ratinho	1081	YHCECRSGWTGVNCDVLSVSCEVAAQKRGI DVTLLCQHGGLCVDEGDKHYHCQAGYTGS	
		* * *	* * *
		EGF29	
Humano	1141	YCEDLVDECSPSPCQNGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVNCSEEIDECLSHPCQNGGTCLD	
Ratinho	1141	YCEDEVDECSPNPCQNGATCTDYLGGFSCKCVAGYHGSNCSEEINECLSQPCQNGGTCLD	
		*****	*****
		EGF30	EGF31
Humano	1201	LPNTYKCS CPRGTQGVHCEINVD DCPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFV	
Ratinho	1201	LTNSYKCS CPRGTQGVHCEINVD DCHPLDPASRSPKCFNNGTCVDQVGGYTCTCPPGFV	
		* * *	* * *
		EGF32	IMUNOGÉNIO (INÍCIO)
Humano	1261	GERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVND FHCERAGHTGRRCESVINGCKGKPCKNNG	
Ratinho	1261	GERCEGDVNECLSNPCDPRGTQNCVQRVND FHCERAGHTGRRCESVINGCRGKPCKNNG	
		*****	*****
		EGF33	EGF34

Fig. 11-2

Humano	1321	TCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTCLCLGPFITG
Ratinho	1321	VCAVASNTARGFICRCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTCLCLGSFTG

		EGF35
Humano	1381	PECQFPASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGGAGRDI
Ratinho	1381	PECQFPASSPCVGSNPCYNQGTCEPTSENPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFTGGAGRDI

		EGF36
Humano	1441	PPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF
Ratinho	1441	PPPQIEEACELPECQVDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF

		LNR_A LNR_B
Humano	1501	SDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQCRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLD
Ratinho	1501	SDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQCTEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLD

		LNR_C
Humano	1561	CAEHVPERLAAGTLVVVLLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHQQMIFPYY
Ratinho	1561	CAEHVPERLAAGTLVLVLLPPDQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHQQMIFPYY

		HD-N
Humano	1621	GREEELRKHPKRAAGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPMVDRGSIVYLEI
Ratinho	1621	GHEEELRKHPKIRSTVGWAT-----SSLLPGTS-GGRQRRELDPMDIRGSIVYLEI
		* *****
		S1↑ HD-C
		IMUNOGÉNIO (FINAL)
Humano	1681	DNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMVYA
Ratinho	1671	DNRQCVQSSQCFQSATDVA AFLGALASLGSLNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQLHLMVYA

		S2↑ TM
Humano	1741	AAAFVLLFFVGCGLLSRKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNA
Ratinho	1731	AAAFVLLFFVGCGLLSRKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNA

Humano	1801	SDGALMDDNQNEWGDELETKKFRFEEPVLPLDDQTDHRQWTQQHLDAAADLRMSAMAP
Ratinho	1791	SDGALMDDNQNEWGDELETKKFRFEEPVLPLSDQTDHRQWTQQHLDAAADLRMSAMAP

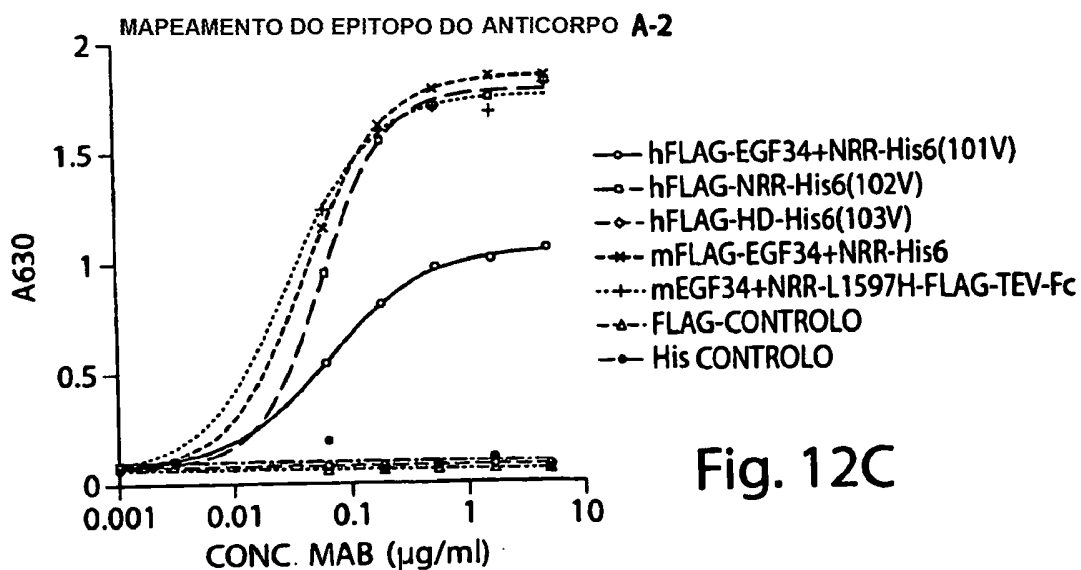
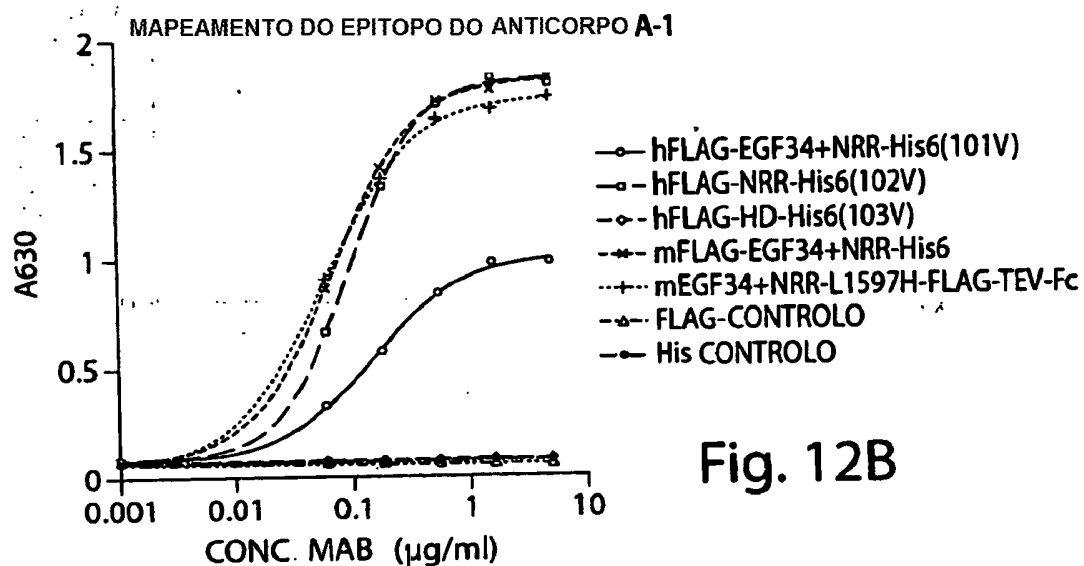
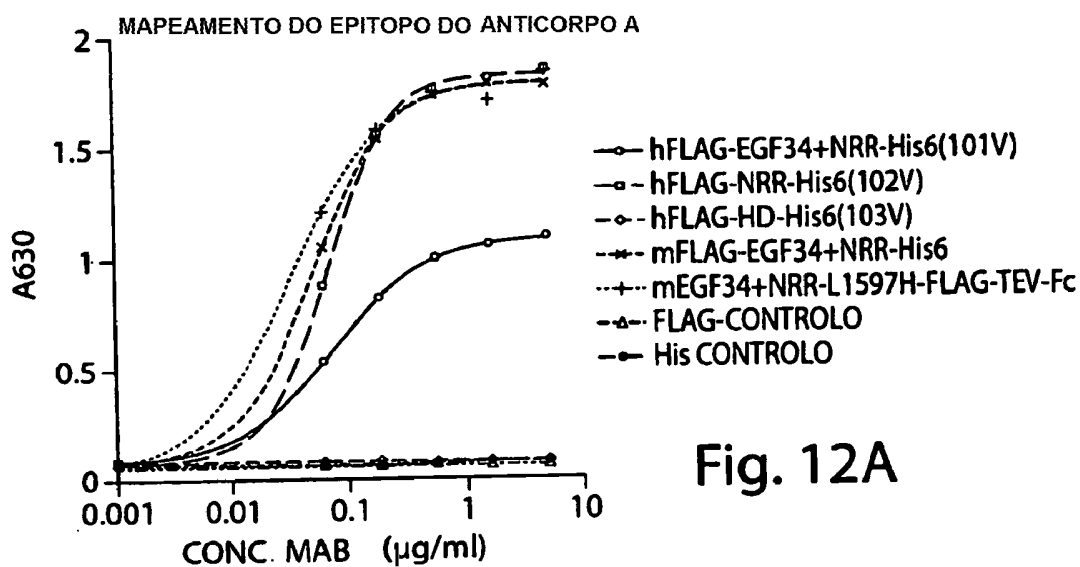
Humano	1861	TPPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASL
Ratinho	1851	TPPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASL

Humano	1921	HNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPLHAAVSADAQGVFQIL
Ratinho	1911	HNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPLHAAVSADAQGVFQIL

Fig. 11-3

Humano	1981	IRNRATDLARMHDGTTPLILAAARLAVEGMLDLINSHADVNAVDDLKGSALHWAAAVNN
Ratinho	1971	LRNRATDLARMHDGTTPLILAAARLAVEGMLDLINSHADVNAVDDLKGSALHWAAAVNN *****
Humano	2041	VDAAVLLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDI TDHMDRLPRDI
Ratinho	2031	VDAAVLLKNGANKDMQNNKEETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDI TDHMDRLPRDI *****
Humano	2101	AQERMHHDIVRLLD EYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGGKVRK
Ratinho	2091	AQERMHHDIVRLLD EYNLVRSPQLHGATLGGTPTLSPTLCSPNGYLGSLKATQGGKARK *****
Humano	2161	PSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKCLLDSSGMLSPVDSLES PHGYLSDVASPPLL
Ratinho	2151	PSTKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKCLLDSSSMLSPVDSLES PHGYLSDVASPPLL ** *****
Humano	2221	SPFQQSPSVPLNHLPCMPDTHLGIGHLNVAAPEMAALGGGRLAFETGPPRLSHLPVAS
Ratinho	2211	SPFQQSPSMPLSHLPMPDTHLGISHLNVAAPEMAALAGGSRLAFEPPLSHLPVAS *****
Humano	2281	GTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAP
Ratinho	2271	SASTVLSTNGTGAMNFTVGAPASLNGQCEWLPRLQNGMVPNQYNPLRPGVTPGTSTQAA ****
Humano	2341	SLQHGMVGPLHSSLAASALSQMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQMQQQNLQPA
Ratinho	2331	GLQHSMGMLHSSLSTNTLSPII-YQGLPNTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQLQPQNLQP- *** * *****
Humano	2401	NIQQQSLQPPPPPPQPHLVSSAASGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSSLAVHTILPQE
Ratinho	2389	-----PSQPHLSVSSAANGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSSLPVHTILPQE * *****
Humano	2461	SPALPTSLPSSLVPPVTAAQFLTPPSQHSYSS-PVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQ
Ratinho	2436	SQALPTSLPSSMVPPMTTQFLTPPSQHSYSSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQ * *****
Humano	2520	WSSSSPHSNVDWSEGVSSPPTSMQSQIARIPEAFK
Ratinho	2496	WSSSSPHSNISDWSEGISSPPTTMSQITHIPEAFK *****

Fig. 11-4



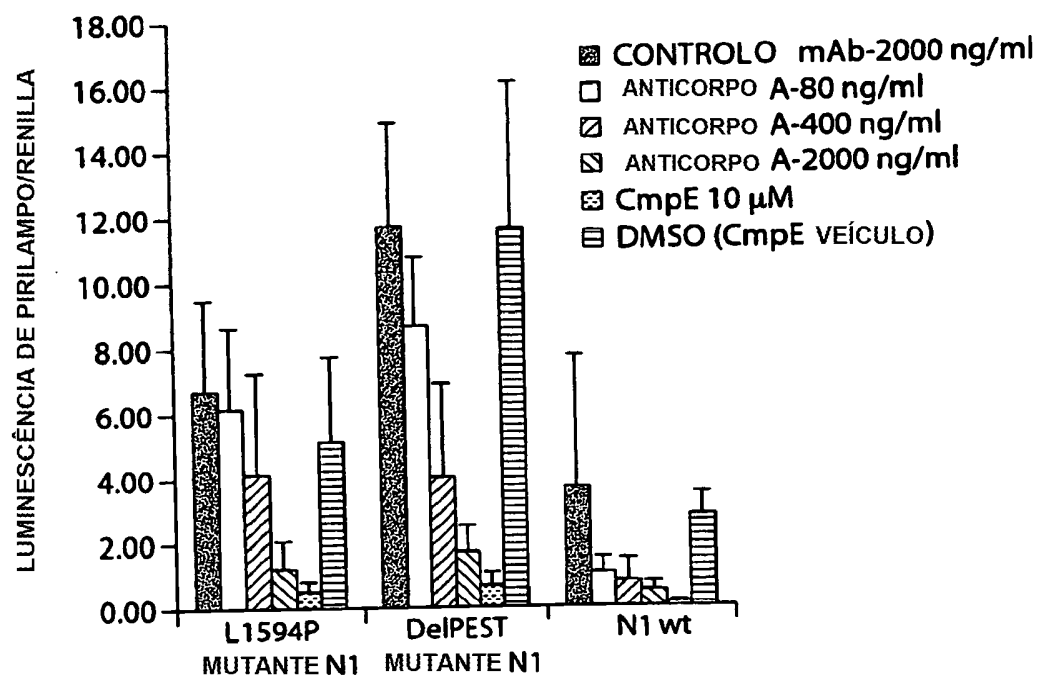


Fig. 13

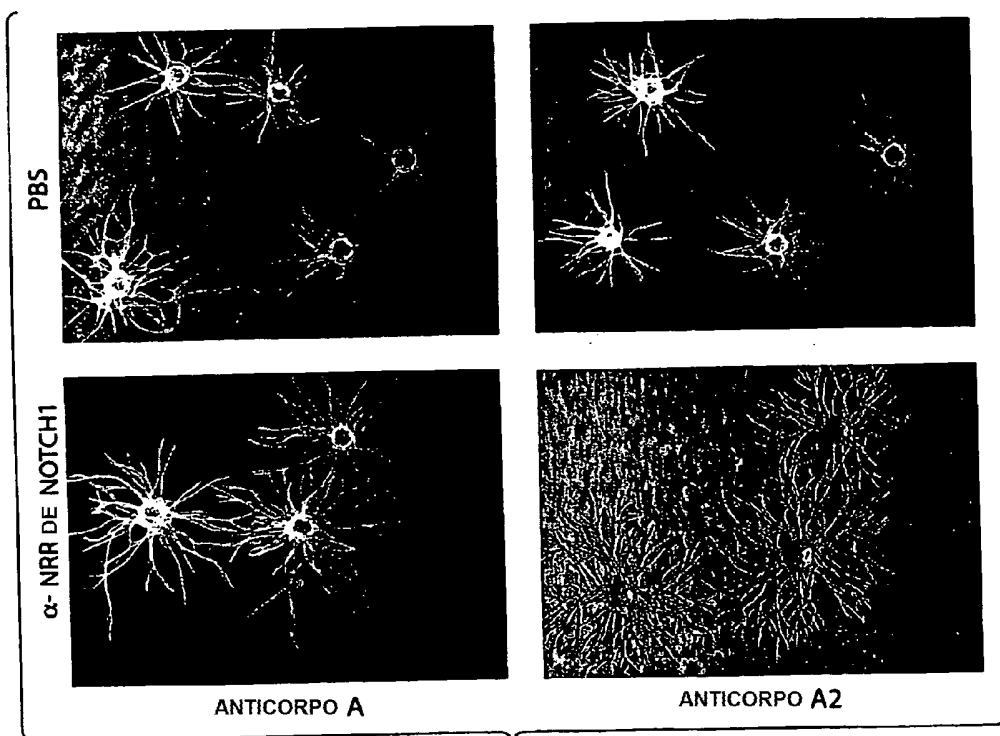
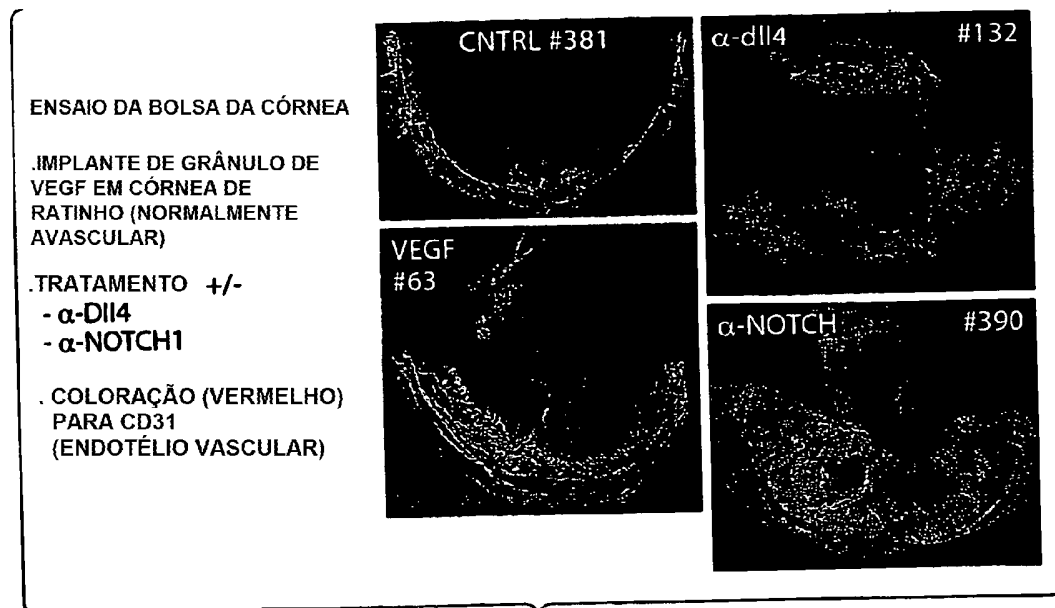


Fig. 14A



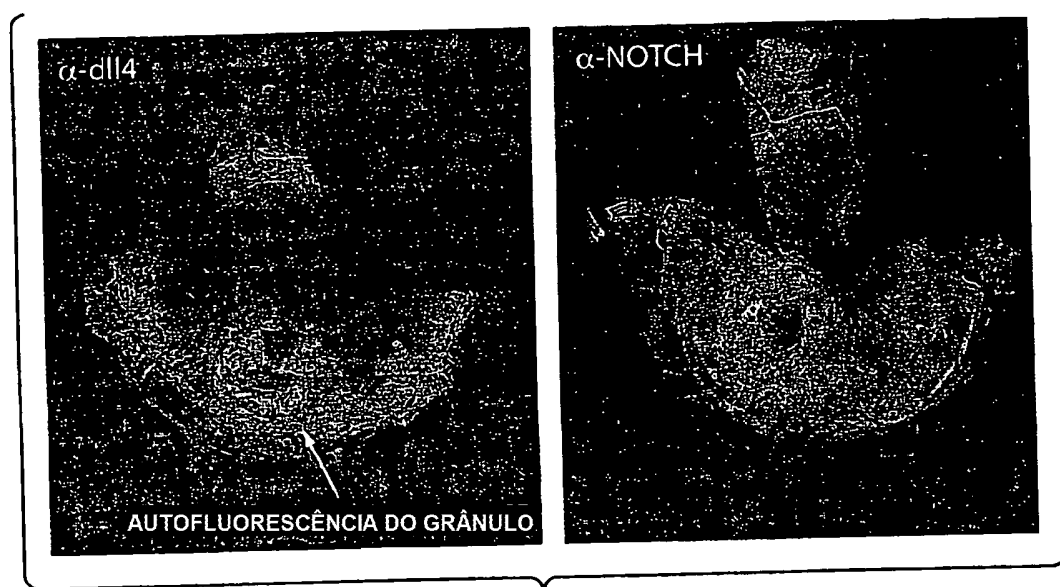
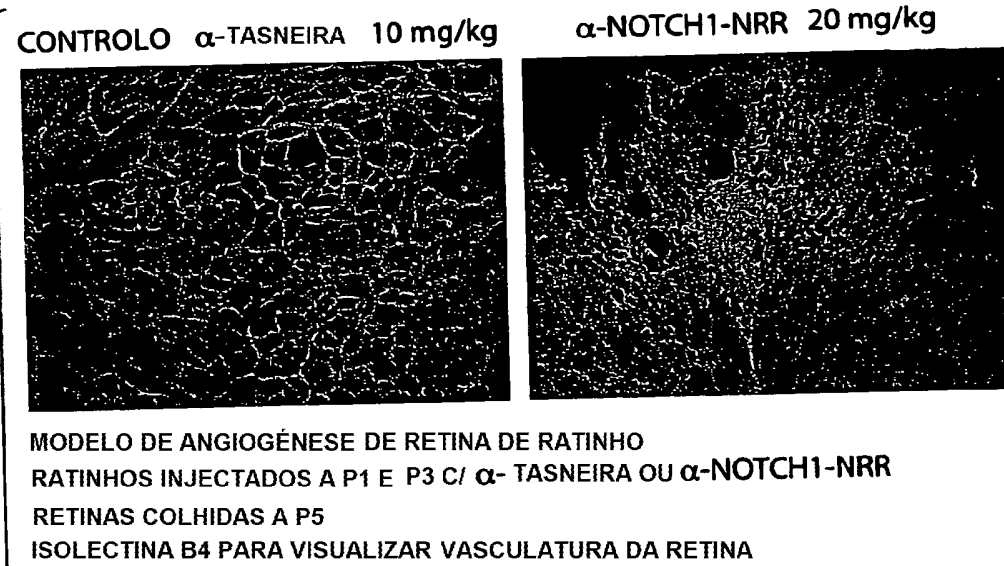


Fig. 14C

**Fig. 14D**

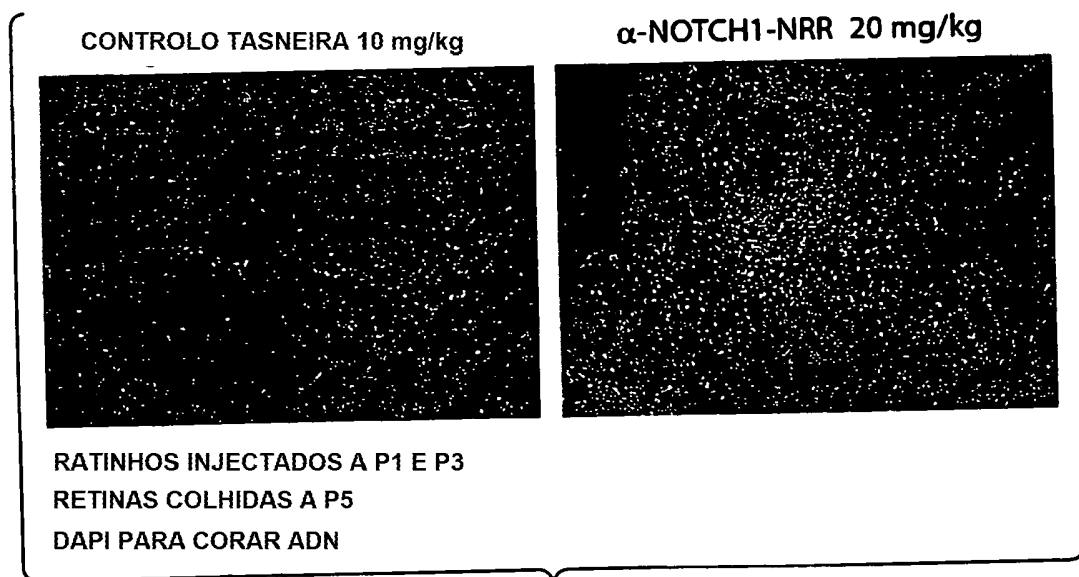
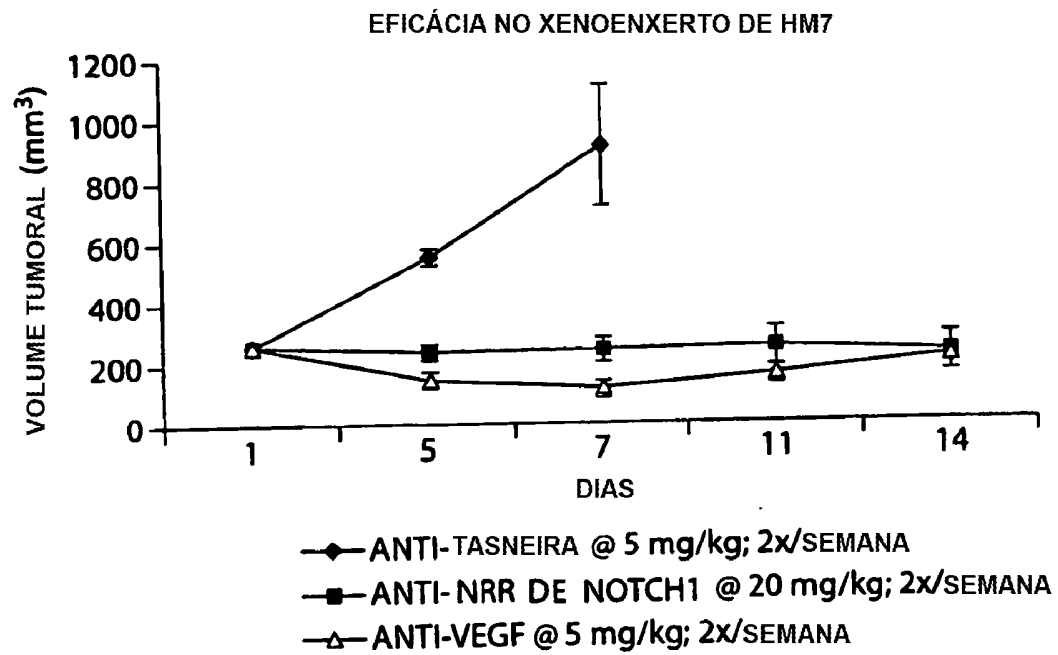
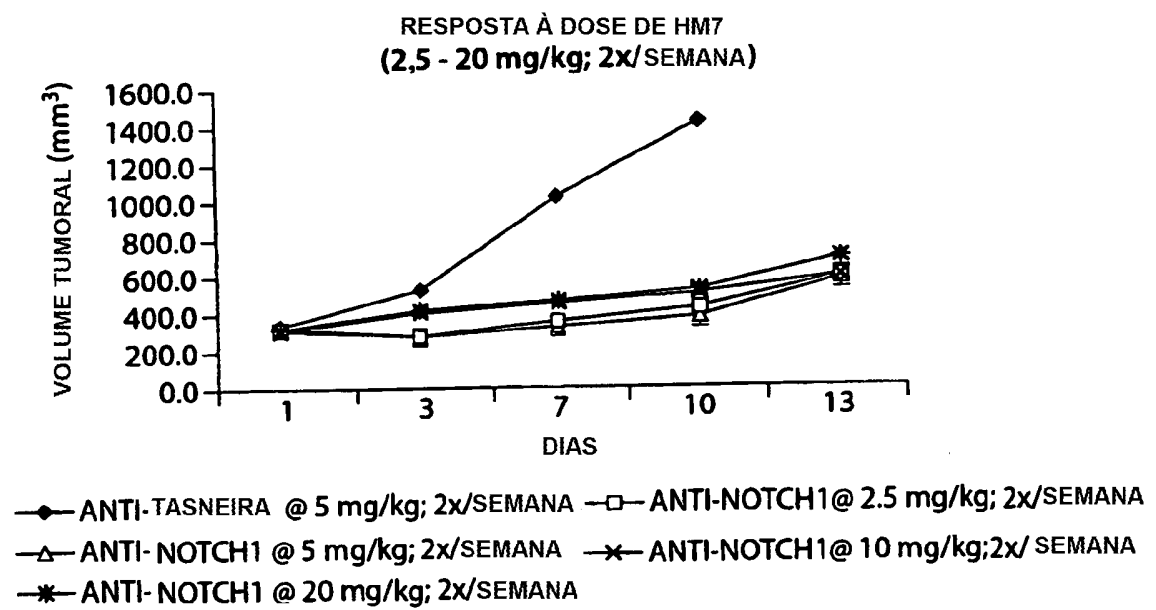
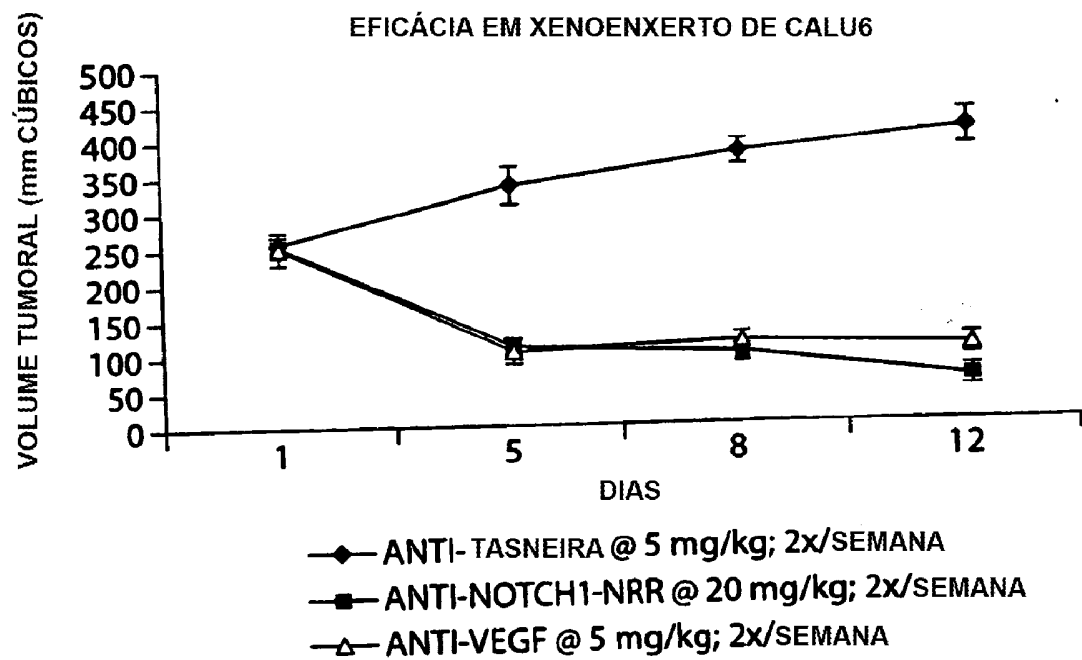
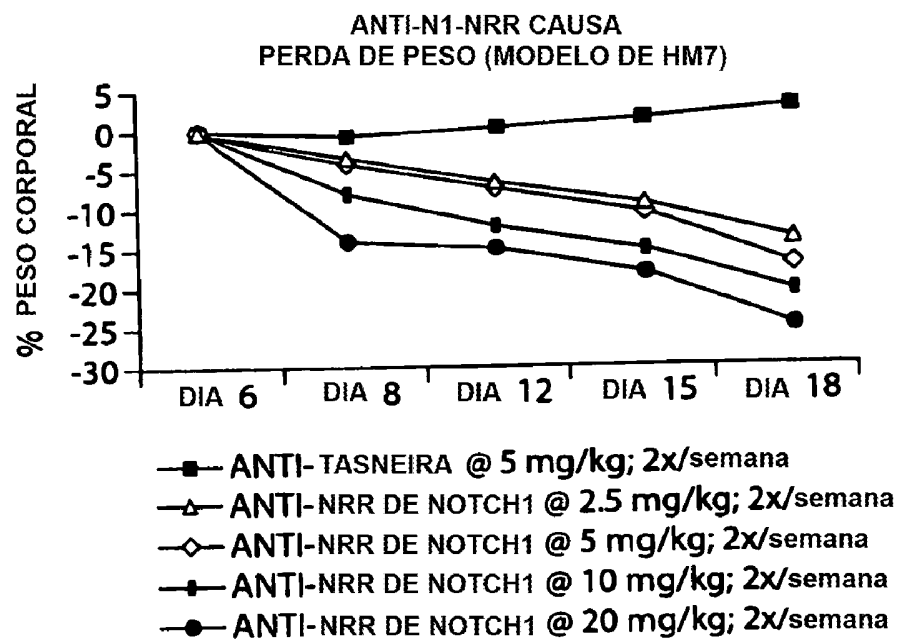


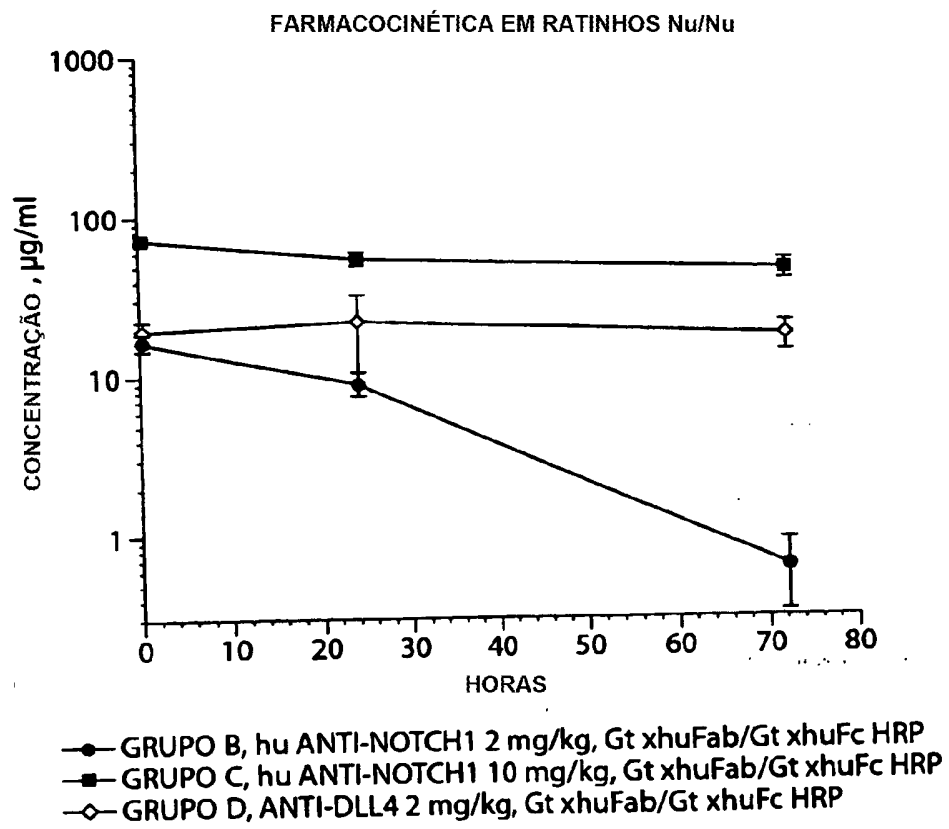
Fig. 14E

**Fig. 15A**

**Fig. 15B**

**Fig. 15C**

**Fig. 15D**

**Fig. 15E**

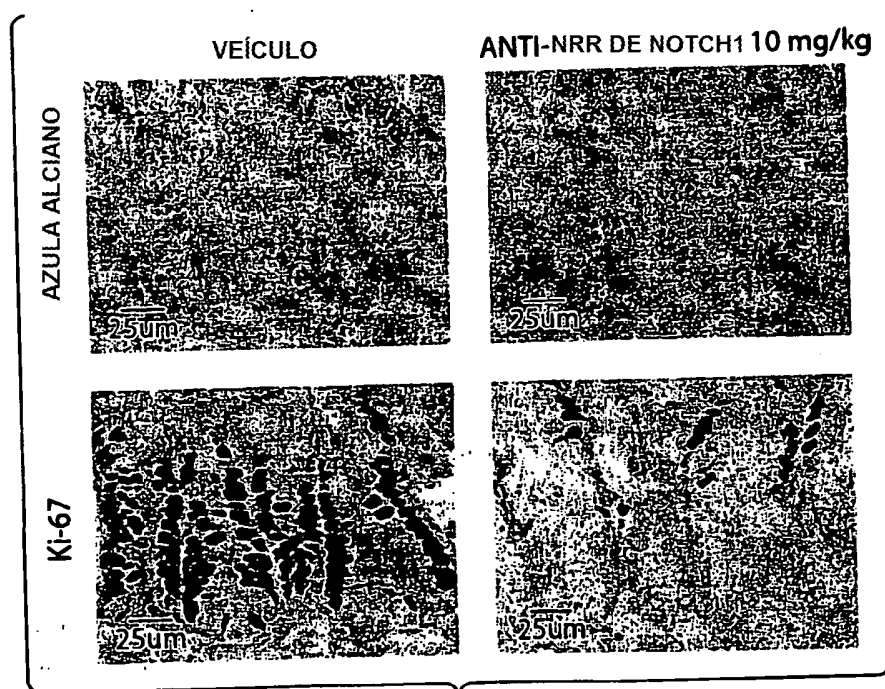


Fig. 16A

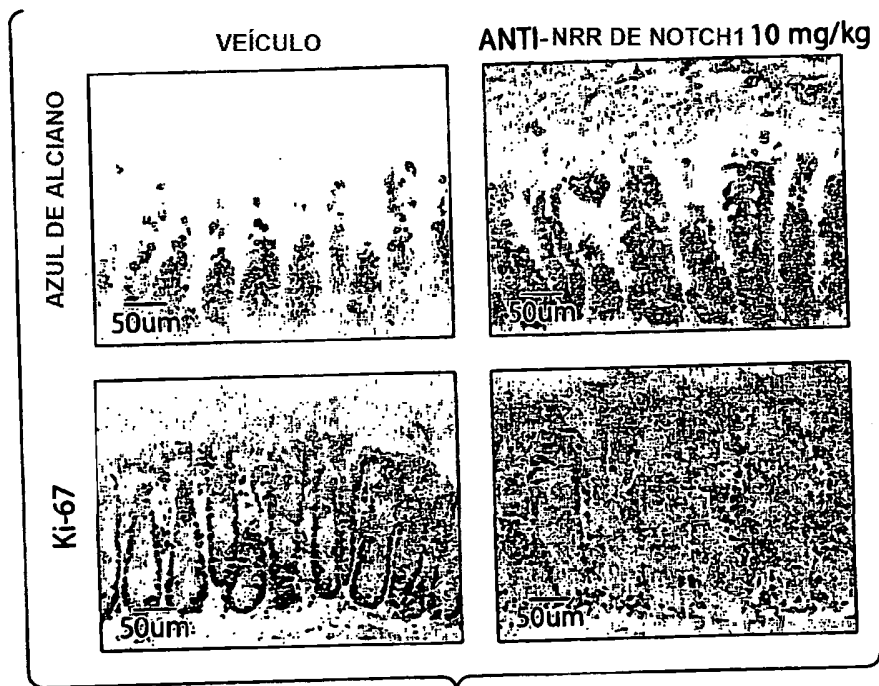


Fig. 16B

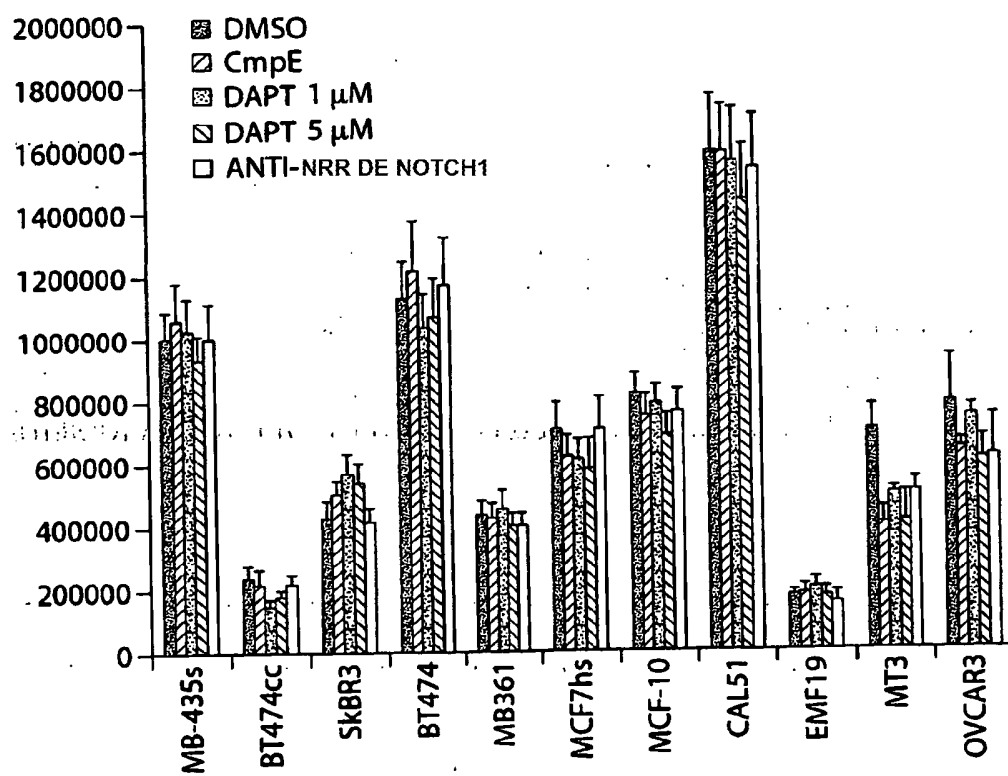


Fig. 17