



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112012007252-8 A2



(22) Data do Depósito: 29/09/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) Título: USO DE UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE NOTCH3, ANTICORPO E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM CÂNCER

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 35/02.

(30) Prioridade Unionista: 30/09/2009 US 61/247,298

(71) Depositante(es): GENENTECH INC.

(72) Inventor(es): CHRISTIAN W. SIEBEL.

(86) Pedido PCT: PCT US2010050610 de 29/09/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/041336 de 07/04/2011

(85) Data da Fase Nacional: 30/03/2012

(57) Resumo: USO DE UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE NOTCH3, ANTICORPO E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM CÂNCER A presente invenção refere-se a métodos de tratamento de câncer em geral e de leucemia em particular, utilizando antagonistas Notch1 e Notch3 isoladamente ou em combinação. São também fornecidos métodos e composições de tratamento e diagnóstico de cânceres associados a Notch.

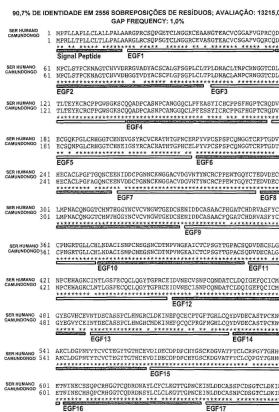


Fig. 1A

**"USO DE UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE NOTCH3, ANTICORPO E
MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM CÂNCER"**

PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindica o benefício com base em 35 USC 5 119 (e) do pedido provisório nº 61/247298, depositado em trinta de setembro de 2009, cujo teor é incorporado ao presente como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos de tratamento de câncer em geral e de leucemia em particular, utilizando antagonistas Notch1 e 10 Notch3 isoladamente ou em combinação. São também fornecidos métodos e composições de tratamento e diagnóstico de cânceres associados a Notch.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida em formato ASCII por meio de EFS-Web e é integralmente 15 incorporada ao presente como referência. A mencionada cópia ASCII, criada em três de setembro de 2010, é denominada P4371.txt e possui 65.600 bytes de tamanho.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A família de receptores Notch é uma classe de receptores 20 transmembrana conservados de forma evolucionária que transmite sinais que afetam o desenvolvimento em organismos tão diversos quanto urquinas marinhas e seres humanos. Os receptores Notch e os seus ligantes Delta e Serrate (conhecidos como Jagged em mamíferos) são proteínas transmembranas com grandes domínios extracelulares que contêm repetições 25 similares a fatores de crescimento epidérmico (EGF). O número de paralogos Notch difere entre as espécies. Existem, por exemplo, 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

processados proteoliticamente durante o transporte para a superfície celular por uma protease do tipo furina em um local S1, que é N-terminal para o domínio transmembrana, produzindo uma subunidade Notch extracelular (ECN) e uma subunidade de transmembrana Notch (NTM). Estas duas 5 subunidades permanecem associadas de forma não covalente e constituem o receptor de superfície de células heterodiméricas maduro.

Subunidades ECN Notch1 contêm 36 repetições similares a EGF N-terminais seguidas por três módulos de repetição de Lin 12/Notch (LNR) repetidos em conjunto que precedem o local S1. ECN Notch3 possui estrutura 10 similar, mas com 34 repetições similares a EGF. Cada módulo de LNR contém três ligações de dissulfeto e um grupo de resíduos ácidos e polares conservados previstos para coordenar um íon de cálcio. Dentro da região de repetição de EGF, existem locais de ligação para os ligantes de ativação. Os NTMs Notch1 e Notch3 compreendem uma região extracelular (que abriga o 15 local de divisão S2), um segmento transmembrana (que abriga o local de divisão S3) e uma grande região intracelular (ICN ou ICD) que inclui um domínio de RAM, repetições de anquirina, um domínio de transativação e uma sequência de PEST carbóxi-terminal. A associação estável das subunidades ECN e NTM depende de um domínio de heterodimerização (HD) que 20 comprehende a extremidade carbóxi-terminal do ECN (denominada HD-N) e da extremidade amino-terminal extracelular de NTM (denominada HD-C). Antes da ativação induzida por ligantes, Notch é mantido em conformação em repouso por uma região reguladora negativa (NRR), que comprehende as três LNRs e o domínio HD.

25 A ligação de um ligante Notch à subunidade ECN inicia duas divisões proteolíticas sucessivas que ocorrem por meio de proteólise intramembranas regulada. A primeira divisão por uma metaloprotease (ADAM17) no local S2 torna a subunidade transmembrana de Notch

susceptível à segunda divisão no local S2 próximo ao folheto interno da membrana de plasma. A divisão do local S3, que é catalisada por um complexo de múltiplas proteínas que contém presenilina e nicastrina e promove a atividade de γ -secretase, libera a parte intracelular da subunidade transmembrana de Notch, o que permite a sua translocação para o núcleo e ativação da transcrição de genes alvo (para análise da divisão proteolítica de Notch, vide, por exemplo, Sisodia et al, *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 281-290, 2002).

Cinco ligantes Notch das classes similares a Delta e Jagged foram identificados em seres humanos (Jagged1 (também denominado Serrate1), Jagged2 (também denominado Serrate2), do tipo Delta 1 (também denominado DLL1), do tipo Delta 3 (também denominado DLL3) e do tipo Delta 4 (também denominado DLL4). Cada um dos ligantes é uma proteína transmembrana de passagem única com um motivo Delta, Serrate, LAG-2 (DSL) N-terminal essencial para a ligação de Notch. Uma série de módulos similares a EGF C-terminais para o motivo DSL precede o segmento que cobre a membrana. Ao contrário dos receptores Notch, os ligantes possuem caudas citoplasmáticas curtas de 70 a 215 aminoácidos no terminal C. Além disso, foram relatados outros tipos de ligantes (tais como DNER, NB3 e F3/Contactina) (para análise de ligantes Notch e ativação de Notch mediada por ligante, vide, por exemplo, D'Souza et al, *Oncogene* 27: 5148-5167, 2008).

O processo Notch funciona durante diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo os que afetam a neurogênese em moscas e vertebrados. De forma geral, a sinalização Notch está envolvida na inibição lateral, decisões de linhagem e no estabelecimento de fronteiras entre grupos de células (vide, por exemplo, Bray, *Mol. Cell Biol.* 7: 678-679, 2006). Demonstrou-se que diversas doenças humanas, incluindo cânceres e distúrbios neurodegenerativos, resultam de mutações em genes que codificam receptores Notch ou seus ligantes (vide, por exemplo, Nam et al, *Curr. Opin.*

Chem. Biol. 6: 501-509, 2002).

O papel de Notch1 como oncoproteína foi demonstrado em leucemia envolvendo progenitores de células T. Este papel foi reconhecido em primeiro lugar em leucemia linfoblástica aguda (T-ALL) (vide, por exemplo,

5 Aster et al, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3: 587-613, 2008). T-ALL é uma leucemia agressiva que aflige preferencialmente crianças e adolescentes. Uma translocação cromossômica t(7; 9)(q34; q34.3) recorrente, que cria uma variante constitutivamente ativa truncada de Notch1 humano, foi identificada em um subconjunto de T-ALLs. Além da translocação (7; 9), mutações 10 frequentes de ganho de função em Notch1 humano foram posteriormente reveladas em mais de 50% de T-ALLs humanos (vide Weng et al, *Science* 306: 269-271, 2004). Essas mutações ocorrem no domínio HD extracelular e no domínio PEST intracelular. Outros estudos demonstraram que a expressão com base retroviral de ICN Notch1 em células de medula óssea causaram T- 15 ALL em modelos de camundongo que receberam as células de medula óssea transplantadas (vide Aster et al, *Mol. Cell Biol.* 20: 7505-7515, 2000).

De forma consistente com este papel para Notch1 em leucemia que envolve progenitores de células T, demonstrou-se que a sinalização Notch1 é essencial para o desenvolvimento de células T em modelos de

20 camundongos e que sinais mediados por Notch1 promovem o desenvolvimento de células T à custa do desenvolvimento de células B (vide, por exemplo, Wilson et al, *J. Exp. Med.* 194: 1003-1012, 2001). Foram descritos papéis adicionais para Notch1 em leucemia. Foram relatadas mutações de ativação 25 no domínio PEST Notch1 sob baixa frequência em leucemia mieloide aguda (AML) humana e em leucemias de mudança de linhagem, o que sugere que a ativação de mutações em Notch1 pode ocorrer em uma célula haste leucêmica que precede mieloide e compromisso de linhagem T (vide Palomero et al, *Leukemia* 20: 1963-1966, 2006).

Antes da revelação das mutações de ganho de função Notch1 frequentes em T-ALL, observou-se que a execução da expressão de ICN Notch3 no timo causou linfoma/leucemia de células T em camundongos transgênicos (vide Bellavia et al, *EMBO J.* 19: 3337-3348, 2000). Também se relatou que mRNA de Notch3 é expresso em todas as trinta amostras de pacientes T-ALL analisadas, enquanto ele não foi detectado em linfócitos T do sangue periférico normais e leucemias não de células T (vide Bellavia et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 3788-3793, 2002).

Notch1 e Notch3 também são associados a diversos outros cânceres. Em tumores sólidos, por exemplo, observou-se aumento da expressão de Notch1 em cânceres humanos da cervical, cólon, pulmão, pâncreas, pele e cérebro (vide, por exemplo, Leong et al, *Blood* 107: 2223-2233, 2006) e elevada expressão de Notch1 é correlacionada com mau resultado em câncer de mama (vide, por exemplo, Parr et al, *Int. J. Mol. Med.* 14: 779-786, 2004; Reedijk et al, *Cancer Res.* 65: 8530-8537, 2005). Foi identificada uma translocação cromossômica (15; 19) em um subconjunto de tumores do pulmão não de células pequenas e acredita-se que a translocação eleve a transcrição de Notch3. Em câncer do ovário, concluiu-se que a amplificação do gene Notch3 ocorre em cerca de 19% dos tumores e a sobre-expressão de Notch3 foi encontrada em mais da metade dos carcinomas de soro do ovário. A sobre-expressão de Notch1 e Notch3 ativados em camundongos transgênicos induz tumores de mama de camundongos e a sobre-expressão de Notch3 é suficiente para induzir a formação de tumores do plexo coroidal em um modelo de camundongos, o que sugere um papel para Notch3 no desenvolvimento de certos tumores cerebrais (para análise de Notch3 em câncer, vide Shih et al, *Cancer Res.* 67: 1879-1882, 2007).

Foram descritos certos anticorpos antagonistas anti-Notch1 que possuem eficácia terapêutica (vide o Pedido de Patente Norte-Americano

publicado n° US 2009/0081238 A1, expressamente incorporado integralmente ao presente como referência). Esses anticorpos ligam-se, por exemplo, à região reguladora negativa (NRR) de Notch1, bloqueiam a sinalização de Notch1, rompem a angiogênese e a vascularização e inibem o crescimento de tumores em modelos de xenoenxerto de camundongos de carcinoma do pulmão não de células pequenas e adenocarcinoma do cólon. Certos anticorpos ali descritos ligam-se a LNR-A e LNR-B (as primeira e segunda das três repetições de LIN12/Notch) e HD-C de NRR Notch1. Também foram descritos outros anticorpos anti-Notch1 que se ligam à região de repetição de EGF de Notch1 e bloqueiam a atividade de Notch1, talvez por meio de bloqueio da ligação de ligantes (vide a Publicação Internacional n° WO 2008/091641).

Foram também descritos certos anticorpos antagonistas anti-Notch3 (vide o Pedido de Patente Norte-Americano publicado n° US 2008/0226621 A1, expressamente incorporado integralmente ao presente como referência). Esses anticorpos ligam-se à região reguladora negativa (NRR) de Notch3 e bloqueiam a sinalização de Notch3. Certos anticorpos ali descritos ligam-se a LNR-A (a primeira das três repetições de LIN12/Notch) e HD-C (denominado alternativamente o segundo domínio de dimerização em US 2008/0226621 A1) de NRR Notch3. Também foram descritos outros anticorpos anti-Notch3 que se ligam à região de repetição do tipo EGF de Notch3 e bloqueiam a atividade de Notch3, talvez por meio de bloqueio da ligação de ligantes (Vide Li et al, *J. Biol. Chem.* 283: 8046-8054, 2008).

Inibidores de gamassecretase (GSIs), que são inibidores de todos os Notch que inibem diversos receptores de Notch, foram propostos para o tratamento de doenças relativas a Notch e, de fato, vêm sendo utilizados em testes clínicos para o tratamento de T-ALL (vide Roy et al, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 52-59, 2007; Deangelo et al, *J. Clin. Oncol.*, Anais da Reunião Anual

da ASCO 2006, Parte I, 24: 6586, 2006). GSIs causam, entretanto, perda de peso e metaplasia de células cálice intestinais, refletindo o papel desempenhado por Notch na determinação do destino celular mantendo a proliferação de células de prole da cavidade intestinal e proibindo a diferenciação em um destino de células secretoras (vide van Es et al, *Nature* 435: 959-963, 2005). Embora estes efeitos colaterais da inibição de todos os Notch possam ser administráveis em um ambiente clínico, os inibidores que se dirigem a receptores Notch individuais e, portanto, minimizam ou reduzem esses efeitos colaterais podem ser vantajosos.

Existe a necessidade na técnica de métodos terapêuticos adicionais de tratamento de câncer por meio de direcionamento a receptores Notch. A invenção descrita no presente atende às necessidades descritas acima e fornece outros benefícios.

DESCRÍÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao tratamento de câncer utilizando antagonistas de Notch isoladamente ou em combinação. A presente invenção refere-se especificamente, em parte, à caracterização de diferentes classes de T-ALL. Uma classe de T-ALL é sensível ao tratamento com GSI e também é sensível ao tratamento com um antagonista específico de Notch1. Por outro lado, uma outra classe de T-ALL é sensível ao tratamento com GSI, mas insensível (ou seja, resistente) a tratamento com um antagonista específico de Notch1. Conforme exibido no presente, esta última classe de T-ALL é parcialmente sensível a tratamento com um antagonista específico de Notch3 e ainda mais sensível a uma combinação de um antagonista específico de Notch1 e um antagonista específico de Notch3. Estes resultados sugerem um papel de Notch1 e Notch3 em leucemias, particularmente leucemias progenitoras de células T tais como T-ALL.

Em um aspecto, é fornecido um método de tratamento de um

câncer sensível a GSI e não reage a um antagonista específico de Notch1, em que o método compreende a administração a um paciente que possui esse câncer de uma quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch3. Em certas realizações, o câncer é leucemia de células T. Em certas realizações, a 5 leucemia de células T é uma leucemia linfooblástica. Em certas realizações, a leucemia de células T é T-ALL. Em certas realizações, o antagonista específico de Notch3 é um anticorpo antagonista anti-Notch3. Em certas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch3 é um anticorpo NRR anti-Notch3. Em certas realizações, o anticorpo NRR anti-Notch3 liga-se aos domínios LNR-A e HD-C 10 de NRR Notch3. Em certas realizações, o anticorpo NRR anti-Notch3 comprehende as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de CDRs do anticorpo 256A-4 ou 256A-8. Em certas realizações, o anticorpo NRR anti-Notch3 é uma forma humanizada do anticorpo 256A-4 ou 256A-8. Em certas 15 realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch3 é um anticorpo anti-Notch3 que se liga a uma ou mais repetições similares a EGF de Notch3.

Em uma realização adicional, o método compreende adicionalmente a administração de uma quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch1. Em certas realizações, o antagonista específico de Notch1 que é administrado é um anticorpo antagonista anti-Notch1. Em certas 20 realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo NRR anti-Notch1. Em certas realizações, o anticorpo NRR anti-Notch1 liga-se aos domínios LNR-A, LNR-B e HD-C de NRR Notch1. Em certas realizações, o anticorpo NRR anti-Notch1 é selecionado a partir do Anticorpo A, A-1, A-2 e A-3. Em certas realizações, o anticorpo NRR anti-Notch1 comprehende as regiões 25 variáveis de cadeia leve e pesada de CDRs de um anticorpo selecionado a partir do Anticorpo A, A-1, A-2 e A-3. Em certas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo anti-Notch1 que se liga a uma ou mais repetições similares a EGF de Notch1.

Em um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um anticorpo que se liga a ICD Notch3 ativado. Em certas realizações, o anticorpo liga-se ao peptídeo de SEQ ID N° 4. Em certas realizações, o anticorpo é policlonal. Em certas realizações, o anticorpo é monoclonal.

5 Em um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um método de identificação de câncer que é apropriado para tratamento com um antagonista de Notch3, em que o método compreende o contato de uma amostra do câncer com o anticorpo conforme definido na reivindicação 15 e determinação se níveis significativamente mais altos de Notch3 ativado estão 10 presentes na amostra, em que a presença de níveis significativamente mais altos de Notch3 ativado indica que o câncer é apropriado para tratamento com um antagonista de Notch3. Em certas realizações, o câncer é sensível a GSI.

Os aspectos e realizações acima e adicionais de acordo com a presente invenção são fornecidos no presente.

15 **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

As Figuras 1A a 1D exibem um alinhamento de Notch1 humano (SEQ ID N° 1) e Notch1 de camundongo (SEQ ID N° 2), com motivos e outras características indicadas.

A Figura 2 exibe a sequência de Notch3 humano (SEQ ID N° 3).
20 A região de repetição EGF estende-se do resíduo de aminoácido 43 a 1383; os módulos de LNR estendem-se do resíduo de aminoácido 1384 a 1503, em que LNR-A estende-se a partir dos resíduos de aminoácidos 1384 a 1422; e o domínio de dimerização estende-se do resíduo de aminoácido 1504 a 1640, em que HD-C estende-se a partir dos resíduos de aminoácidos 1572 a 1640.

25 As Figuras 3A a 3D demonstram que a linhagem de células T-ALL, P-12 Ichikawa, é resistente a GSI (DAPT) e anti-NRR1 (α -N1).

As Figuras 4A a 4D demonstram que a linhagem de células T-ALL, HPB-ALL, é sensível a GSI (DAPT) e anti-NRR1 (α -N1), conforme

evidenciado pelo acúmulo de células em G0/G1 e pela redução de células em S/G2/M, com relação a células controle.

As Figuras 5A a 5D demonstram que a linhagem de células T-ALL, TALL-1, é sensível a GSI mas resistente a anti-NRR1 (α -N1).

5 A Figura 6 demonstra que medições do tamanho celular refletem as três classes de T-ALL identificadas nas Figuras 3 a 5.

A Figura 7 demonstra que manchas com Anexina V (marcador da apoptose) e 7-AAD (marcador da morte celular) refletem as três classes de T-ALL identificadas nas Figuras 3 a 5.

10 A Figura 8, quadro esquerdo, demonstra que manchas de Ki-67 (marcador da proliferação celular) refletem as três classes de T-ALL identificadas nas Figuras 3 a 5. Picos voltados para a esquerda indicam manchas inferiores para Ki-67 e proliferação reduzida com relação a picos voltados para a direita. A Figura 8, quadro direito, demonstra que a redução 15 das manchas para Ki-67 (ou seja, redução da proliferação) apresenta correlação inversa com o número de células negativas duplas Anexina V/7-AAD (ou seja, não apoptóticas).

20 As Figuras 9A a 9F demonstram que a linhagem de células TALL-1 é parcialmente sensível a anti-NRR3 (α -N3) e sensível a tratamento com anti-NRR1 (α -N1) e anti-NRR3.

As Figuras 10A a 10F demonstram que a linhagem de células T-ALL, CCRF-CEM, é resistente a GSI, anti-NRR1 (α -N1) e anti-NRR3 (α -N3).

As Figuras 11A a 11F demonstram que a linhagem de células HPB-ALL é sensível a anti-NRR1 (α -N1), mas não a anti-NRR3 (α -N3).

25 A Figura 12 exibe uma imunomancha utilizando um anticorpo que reconhece ICD de Notch3 ativado (ICD α -Notch3), que detecta ICD de Notch3 ativado na fração nuclear de células MDA-MB-468 estimuladas por Jag 1.

A Figura 13 demonstra que a linhagem de células TALL-1

expressa altos níveis de Notch3 ativado dividido (quadro inferior), que podem ser bloqueados por DAPT, mas não anti-NRR1 (α -N1), enquanto a linhagem de células HPB-ALL expressa altos níveis de Notch1 ativado dividido, que podem ser bloqueados por DAPT e anti-NRR1 (α -N1).

5 A Figura 14 exibe um gráfico dos resultados dos experimentos ilustrados nas Figuras 9A a 9F.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. DEFINIÇÕES

Para fins de interpretação do presente relatório descritivo, aplicar-se-ão as definições a seguir e, sempre que apropriado, os termos utilizados no singular também incluirão o plural e vice-versa. Caso qualquer definição estabelecida abaixo entre em conflito com qualquer documento incorporado ao presente como referência, deverá ser considerada a definição descrita abaixo.

O termo “Notch”, da forma utilizada no presente, designa, a menos que indicado específica ou contextualmente em contrário, qualquer polipeptídeo Notch nativo ou variante (seja nativo ou sintético) (Notch1-4). A expressão “sequência nativa” engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural (tais como sequência de domínio extracelular ou sequência de subunidade de transmembrana), formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência natural. A expressão “Notch do tipo selvagem” indica geralmente um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de proteína Notch sem mutação de ocorrência natural. A expressão “sequência de Notch do tipo selvagem” designa geralmente uma sequência de aminoácidos encontrada em Notch sem mutação de ocorrência natural.

O termo “Notch1”, da forma utilizada no presente, designa, a menos que indicado específica ou contextualmente em contrário, qualquer polipeptídeo Notch1 nativo ou variante (seja nativo ou sintético). A expressão

“sequência nativa” engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural (tais como sequência de domínio extracelular ou sequência de subunidade de transmembrana), formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência natural. A expressão “Notch1 do tipo selvagem” indica geralmente um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de proteína Notch1 sem mutação de ocorrência natural. A expressão “sequência de Notch1 do tipo selvagem” designa geralmente uma sequência de aminoácidos encontrada em Notch1 sem mutação de ocorrência natural.

A expressão “ligante de Notch1”, da forma utilizada no presente, designa, a menos que indicado específica ou contextualmente em contrário, qualquer polipeptídeo ligante Notch1 nativo ou variante (seja nativo ou sintético) (tal com Jagged1, Jagged2, do tipo Delta 1, do tipo Delta 3 e/ou do tipo Delta 4). A expressão “sequência nativa” engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural (tais como sequência de domínio extracelular ou sequência de subunidade de transmembrana), formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência natural. A expressão “ligante Notch1 do tipo selvagem” indica geralmente um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de uma proteína Notch1 sem mutação de ocorrência natural. A expressão “sequência de ligante Notch1 do tipo selvagem” designa geralmente uma sequência de aminoácidos encontrada em ligante Notch1 sem mutação de ocorrência natural.

A expressão “NRR Notch1”, da forma utilizada no presente, designa, a menos que indicado específica ou contextualmente em contrário, qualquer região de polipeptídeo variante ou nativa (seja nativa ou sintética) de Notch1 que consiste dos três módulos de LNR e as sequências de aminoácidos que se estendem a partir do terminal carbóxi dos módulos de LNR

até o domínio transmembrana, em que essas sequências incluem o domínio HD (HD-N e HD-C). Exemplos de NRR Notch1 consistem da região de cerca do aminoácido 1446 a cerca do aminoácido 1735 da sequência de aminoácidos Notch1 humana (SEQ ID N° 1, Figura 1) e a região de cerca do 5 aminoácido 1446 até cerca do aminoácido 1725 da sequência de aminoácidos Notch1 de camundongo (SEQ ID N° 2, Figura 1). A expressão “NRR Notch1 de sequência nativa” engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural, formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência natural de um 10 NRR Notch1. A expressão “NRR Notch1 do tipo selvagem” designa, de forma geral, um NRR Notch1 sem mutação de ocorrência natural. Em algumas realizações, um NRR Notch1 está contido em um Notch1, tal como um Notch1 processado no(s) local(is) S1, S2 e/ou S3 ou um Notch1 não processado. Em algumas realizações, um NRR Notch1 contém dois ou mais fragmentos ligados 15 de forma não covalente de uma sequência de aminoácidos NRR Notch1, tais como um fragmento que contém os aminoácidos 1446 a 1664 de SEQ ID N° 1 ligado de forma não covalente a um fragmento que contém os aminoácidos 1665 a 1735 de SEQ ID N° 1. Em uma outra realização, um fragmento que contém os aminoácidos 1446 a 1654 de SEQ ID N° 2 é ligado de forma não 20 covalente a um fragmento que contém os aminoácidos 1655 a 1725 de SEQ ID N° 2.

A expressão “sinalização de Notch1 aumentada”, da forma utilizada no presente, designa um aumento da sinalização de Notch1 que está significativamente acima do nível de sinalização de Notch1 observado em um 25 controle sob condições substancialmente idênticas. Em certas realizações, o aumento da sinalização de Notch1 é de pelo menos duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes ou dez vezes acima do nível observado no controle.

A expressão “sinalização de Notch1 reduzida”, da forma utilizada

no presente, designa uma redução da sinalização de Notch1 que está significativamente abaixo do nível de sinalização de Notch1 observado em um controle sob condições substancialmente idênticas. Em certas realizações, a redução da sinalização de Notch1 é de pelo menos duas vezes, três vezes, 5 quatro vezes, cinco vezes ou dez vezes abaixo do nível observado no controle.

Em certas realizações, a sinalização de Notch1 (ou seja, aumento ou redução da sinalização de Notch1) é determinada utilizando um teste relator apropriado, tal como conforme descrito no Exemplo 5 do Pedido de Patente Norte-Americano publicado n° US 2009/0081238 A1. Em certas realizações, a 10 sinalização de Notch1 é determinada utilizando um teste de atividade *in vitro*, tal como o teste de diferenciação de mioblastas C2C12 ou o teste de brotos de células HUVEC, conforme descrito nos Exemplos 5 e 7, respectivamente, de US 2009/0081238 A1. Em certas realizações, a sinalização Notch1 é determinada utilizando um modelo de xenoenxerto *in vivo*, tal como os modelos 15 Calu6 e HM7 descritos no Exemplo 8 de US 2009/0081238 A1.

As expressões “mutação de ativação de Notch1” e “mutação que ativa a sinalização de Notch1” designam uma inserção de um ou mais aminoácidos, uma exclusão de um ou mais aminoácidos ou uma substituição de um ou mais aminoácidos com relação a uma sequência de aminoácidos do tipo selvagem Notch1 que resulta em aumento da sinalização de Notch1 em comparação com a sinalização de Notch1 da sequência de aminoácidos do tipo selvagem Notch1 correspondente, ou a uma inserção de um ou mais nucleotídeos, exclusão de um ou mais nucleotídeos, translocação de um ou mais nucleotídeos ou substituição de um ou mais nucleotídeos com relação a 20 uma sequência de ácidos nucleicos do tipo selvagem Notch1 que resulta em aumento da sinalização de Notch1 em uma célula que contém a sequência de ácidos nucleicos mutantes em comparação com a sinalização de Notch1 em uma célula que contém a sequência de ácidos nucleicos do tipo selvagem de 25

Notch1 correspondente. Sinalização de Notch1 de um receptor de Notch1 que contém uma mutação de ativação pode ser dependente de ligante ou independente de ligante.

A expressão "anticorpo anti-Notch1" ou "anticorpo que se liga a Notch1" designa um anticorpo que é capaz de ligar Notch1 com afinidade suficiente, de tal forma que o anticorpo seja útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico dirigido a Notch1. Preferencialmente, a extensão da ligação de um anticorpo anti-Notch1 a uma proteína não de Notch não relacionada é de menos de cerca de 10% da ligação do anticorpo a Notch1 conforme medido, por exemplo, por meio de um radioimunoteste (RIA). Em certas realizações, um anticorpo que se liga a Notch1 possui uma constante de dissociação (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 0,5 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 50 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 5 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,5 \text{nM}$ ou $\leq 0,1 \text{nM}$. Em certas realizações, um anticorpo anti-Notch1 liga-se a um epítopo de Notch1 que é conservado entre Notch1 de diferentes espécies, tais como roedores (ratos e camundongos) e primatas.

A expressão "anticorpo NRR anti-Notch1" ou "anticorpo que se liga a NRR Notch1" designa um anticorpo que é capaz de ligar NRR Notch1 com afinidade suficiente, de tal forma que o anticorpo seja útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico no direcionamento a Notch1. Preferencialmente, a extensão da ligação de um anticorpo NRR anti-Notch1 a uma proteína não de Notch não relacionada é de menos de cerca de 10% da ligação do anticorpo a NRR Notch1 conforme medido, por exemplo, por meio de um radioimunoteste (RIA). Em certas realizações, um anticorpo que se liga a NRR Notch1 possui uma constante de dissociação (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 0,5 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 50 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 5 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,5 \text{nM}$ ou $\leq 0,1 \text{nM}$. Em certas realizações, um anticorpo NRR anti-Notch1 liga-se a um epítopo de Notch que é conservado entre Notch de diferentes espécies, tais como roedores (ratos e camundongos) e primatas.

A expressão “antagonista específico de Notch1” designa um agente que efetua sinalização de Notch1 reduzida, conforme definido acima, e não afeta significativamente a sinalização por outro receptor de Notch (Notch2, 3 ou 4 em mamíferos).

5 “Anticorpo antagonista anti-Notch1” é um anticorpo anti-Notch1 (que inclui um anticorpo NRR anti-Notch1) que realiza redução da sinalização de Notch1, conforme definido acima.

Referência a “Anticorpo A, A-1, A-2 e A-3”, isoladamente ou em qualquer combinação, indica as regiões variáveis de cadeia leve e pesada do fago e anticorpos reformatados denominados Anticorpo A, A-1, A-2 e A-3 no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº US 2009/0081238 A1, a menos que indicado em contrário.

O termo “Notch3”, da forma utilizada no presente, designa, a menos que indicado específica ou contextualmente em contrário, qualquer 15 polipeptídeo Notch3 nativo ou variante (seja nativo ou sintético). A expressão “sequência nativa” engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural (tais como sequência de domínio extracelular ou sequência de subunidade de transmembrana), formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência 20 natural. A expressão “Notch3 do tipo selvagem” indica geralmente um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de proteína Notch3 sem mutação de ocorrência natural. A expressão “sequência de Notch3 do tipo selvagem” designa geralmente uma sequência de aminoácidos encontrada em Notch3 sem mutação de ocorrência natural.

25 A expressão “ligante de Notch3”, da forma utilizada no presente, designa, a menos que indicado específica ou contextualmente em contrário, qualquer polipeptídeo ligante Notch3 nativo ou variante (seja nativo ou sintético) (tal com Jagged1, Jagged2, do tipo Delta 1, do tipo Delta 3 e/ou do

tipo Delta 4). A expressão “sequência nativa” engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural (tais como sequência de domínio extracelular ou sequência de subunidade de transmembrana), formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência natural. A expressão “ligante Notch3 do tipo selvagem” indica geralmente um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de uma proteína Notch3 sem mutação de ocorrência natural. A expressão “sequência de ligante Notch3 do tipo selvagem” designa geralmente uma sequência de aminoácidos encontrada em um ligante Notch3 sem mutação de ocorrência natural.

A expressão “ICD Notch3 ativado” designa o produto de divisão de Notch3 que resulta da divisão no local S3 e que é capaz de translocação para o núcleo. Em certas realizações, ICD Notch3 ativado consiste de aminoácidos 1662-2321 de Notch3 humano (SEQ ID N° 3).

A expressão “NRR Notch3”, da forma utilizada no presente, designa, a menos que indicado específica ou contextualmente em contrário, qualquer região de polipeptídeo variante ou nativa (seja nativa ou sintética) de Notch3 que consiste dos três módulos de LNR e as sequências de aminoácidos que se estendem a partir do terminal carbóxi dos módulos de LNR até o domínio transmembrana, em que essas sequências incluem o domínio HD (HD-N e HD-C). Exemplos de NRR Notch3 consistem da região de cerca do aminoácido 1384 a cerca do aminoácido 1640 da sequência de aminoácidos Notch3 humana (SEQ ID N° 3, Figura 2). A expressão “NRR Notch3 de sequência nativa” engloba especificamente formas truncadas de ocorrência natural, formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência natural de um NRR Notch3. A expressão “NRR Notch3 do tipo selvagem” designa, de forma geral, um NRR Notch3 sem mutação de ocorrência natural. Em algumas

realizações, um NRR Notch3 está contido em um Notch3, tal como um Notch3 processado no(s) local(is) S1, S2 e/ou S3 ou um Notch3 não processado. Em algumas realizações, um NRR Notch3 contém dois ou mais fragmentos ligados de forma não covalente de uma sequência de aminoácidos NRR Notch3, tais como um fragmento que contém os aminoácidos 1384 a 1571 de Notch3 humano (SEQ ID N° 3) ligado de forma não covalente a um fragmento que contém os aminoácidos 1572 a 1640 de Notch3 humano (SEQ ID N° 3).

A expressão “sinalização de Notch3 aumentada”, da forma utilizada no presente, designa um aumento da sinalização de Notch3 que está significativamente acima do nível de sinalização de Notch3 observado em um controle sob condições substancialmente idênticas. Em certas realizações, o aumento da sinalização de Notch3 é de pelo menos duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes ou dez vezes acima do nível observado no controle.

A expressão “sinalização de Notch3 reduzida”, da forma utilizada no presente, designa uma redução da sinalização de Notch3 que está significativamente abaixo do nível de sinalização de Notch3 observado em um controle sob condições substancialmente idênticas. Em certas realizações, a redução da sinalização de Notch3 é de pelo menos duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes ou dez vezes abaixo do nível observado no controle.

Em certas realizações, a sinalização de Notch3 (ou seja, aumento ou redução da sinalização de Notch3) é determinada utilizando um teste relator apropriado, tal como conforme descrito no Exemplo 5 do Pedido de Patente Norte-Americano publicado n° US 2008/0226621 A1. Em certas realizações, a sinalização de Notch3 é determinada utilizando um teste de atividade *in vitro*, tal como os testes de apoptose, migração celular, invasão e morfologia descritos no Exemplo 7 do Pedido de Patente Norte-Americano publicado n° US 2008/0226621 A1. Em certas realizações, a sinalização Notch3 é determinada utilizando um modelo de xenoenxerto *in vivo*, tal como os

descritos no Exemplo 11 de US 2008/0226621 A1.

A expressão “anticorpo anti-Notch3” ou “anticorpo que se liga a Notch3” designa um anticorpo que é capaz de ligar Notch3 com afinidade suficiente, de tal forma que o anticorpo seja útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico no direcionamento a Notch3. Preferencialmente, a extensão da ligação de um anticorpo anti-Notch3 a uma proteína não de Notch não relacionada é de menos de cerca de 10% da ligação do anticorpo a Notch3 conforme medido, por exemplo, por meio de um radioimunoteste (RIA). Em certas realizações, um anticorpo que se liga a NRR Notch3 possui uma constante de dissociação (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 0,5 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 50 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 5 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,5 \text{nM}$ ou $\leq 0,1 \text{nM}$. Em certas realizações, um anticorpo anti-Notch3 liga-se a um epítopo de Notch3 que é conservado entre Notch3 de diferentes espécies, tais como roedores (ratos e camundongos) e primatas.

A expressão “anticorpo NRR anti-Notch3” ou “anticorpo que se liga a NRR Notch3” designa um anticorpo que é capaz de ligar NRR Notch3 com afinidade suficiente, de tal forma que o anticorpo seja útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico dirigido a Notch3. Preferencialmente, a extensão da ligação de um anticorpo NRR anti-Notch3 a uma proteína não de Notch não relacionada é de menos de cerca de 10% da ligação do anticorpo a NRR Notch3 conforme medido, por exemplo, por meio de um radioimunoteste (RIA). Em certas realizações, um anticorpo que se liga a NRR Notch3 possui uma constante de dissociação (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 0,5 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 50 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 5 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,5 \text{nM}$ ou $\leq 0,1 \text{nM}$. Em certas realizações, um anticorpo NRR anti-Notch3 liga-se a um epítopo de Notch3 que é conservado entre Notch3 de diferentes espécies, tais como roedores (ratos e camundongos) e primatas.

A expressão “antagonista específico de Notch3” designa um

agente que efetua sinalização de Notch3 reduzida, conforme definido acima, e não afeta significativamente a sinalização por outro receptor de Notch (Notch1, 2 ou 4 em mamíferos).

“Anticorpo antagonista anti-Notch3” é um anticorpo anti-Notch3
5 (que inclui um anticorpo NRR anti-Notch3) que realiza redução da sinalização de Notch3, conforme definido acima.

Referência a “anticorpo 256A-4 e 256A-8”, isoladamente ou em combinação, indica os anticorpos monoclonais de camundongo denominados 256A-4 e 256A-8 no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 10 2008/0226621 A1.

O termo “antagonista” designa um agente que inibe significativamente (parcial ou completamente) a atividade biológica de uma molécula alvo.

Um “anticorpo que liga ICD Notch3 ativado” designa um anticorpo 15 que liga ICD Notch3 de tal forma que o anticorpo seja útil na diferenciação de ICD Notch3 ativado a partir de Notch3 que compreende um NTM intacto.

O termo “anticorpo” é utilizado no presente no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (tais como anticorpos biespecíficos) formados a 20 partir de pelo menos dois anticorpos intactos e fragmentos de anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada.

Anticorpo “isolado” é aquele que tenha sido identificado, separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que 25 interfeririam com utilizações em pesquisa, diagnóstico ou terapêuticas para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em algumas realizações, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo, conforme determinado, por exemplo, por

meio do método de Lowry, e, em algumas realizações, mais de 99% em peso; (2) até um grau suficiente para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de sequência de aminoácidos interna ou N-terminal, utilizando, por exemplo, um sequenciador de xícara de centrifugação; ou (3) até a homogeneidade, por meio de SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando, por exemplo, azul de Coomassie ou manchas de prata. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por meio de pelo menos uma etapa de purificação.

“Anticorpos nativos” são normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação de dissulfeto covalente, enquanto a quantidade de ligações de dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia leve e pesada também contém pontes de dissulfeto intracadeias em espaços regulares. Cada cadeia pesada contém, em uma extremidade, um domínio variável (V_H) seguido por uma série de domínios constantes. Cada cadeia leve contém um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado ao primeiro domínio constante da cadeia pesada e o domínio variável da cadeia leve é alinhado ao domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem uma superfície intermediária entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada.

A “região variável” ou “domínio variável” de um anticorpo designa os domínios amino-terminais da cadeia pesada ou leve do anticorpo. O domínio variável da cadeia pesada pode ser denominado “VH”. O domínio

variável da cadeia leve pode ser denominado “VL”. Estes domínios são geralmente as partes mais variáveis de um anticorpo e contêm os locais de ligação de抗ígenos.

O termo “variável” indica o fato de que certas partes dos domínios variáveis diferem extensamente de sequência entre os anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico ao seu抗ígeno específico. A capacidade de variação não é, entretanto, distribuída regularmente ao longo de todos os domínios variáveis de anticorpos. Ela é concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis (HVRs), tanto nos domínios variáveis de cadeia leve quanto de cadeia pesada. As partes mais altamente conservadas dos domínios variáveis são denominadas regiões de estrutura (FRs). Cada um dos domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativos compreende quatro regiões FR, que adotam em grande parte configuração de folha beta, conectadas por três HVRs, que formam laços que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura de folha beta. As HVRs de cada cadeia são mantidas juntas em boa proximidade pelas regiões FR e, com as HVRs da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação de抗ígenos de anticorpos (vide Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, National Institute of Health, Bethesda MD (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um抗ígeno, mas exibem várias funções efetoras, tais como a participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpos.

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

Dependendo das sequências de aminoácidos dos domínios

constantes das suas cadeias pesadas, anticorpos (imunoglobulinas) podem ser atribuídos a classes diferentes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias delas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), tais como IgG₁, IgG₂, IgG₃,
5 IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas e descritas, de forma geral, por exemplo, em Abbas et al, *Cellular and Mol.*
10 *Immunology*, quarta edição (W. B. Saunders Co., 2000). Um anticorpo pode ser parte de uma molécula de fusão maior, formada por meio de associação covalente ou não covalente do anticorpo com uma ou mais proteínas ou peptídeos diferentes.

As expressões “anticorpo de comprimento total”, “anticorpo intacto” e “anticorpo inteiro” são utilizadas no presente de forma intercambiável para designar um anticorpo na sua forma substancialmente intacta e não fragmentos de anticorpos conforme definido abaixo. As expressões designam particularmente um anticorpo com cadeias pesadas que contêm uma região Fc.
15

“Anticorpo bruto”, para os propósitos do presente, é um anticorpo que não é conjugado a uma porção citotóxica ou radiomarca.

“Fragmentos de anticorpos” compreendem uma parte de anticorpo intacto, que comprehende preferencialmente a sua região de ligação de抗igenos. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de Fab, Fab’,
25 F(ab’)₂ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpos de fita única; e anticorpos multiespecíficos formados com fragmentos de anticorpos.

A digestão de anticorpos por papaína produz dois fragmentos de ligação de抗igenos idênticos, denominados fragmentos de “Fab”, cada qual

com um único local de ligação de抗ígenos, e um fragmento de "Fc" residual, cujo nome reflete a sua capacidade de rápida cristalização. O tratamento com pepsina gera um fragmento de $F(ab')_2$ que contém dois locais de combinação de抗ígenos e ainda é capaz de reticular抗ígeno.

5 "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de ligação de抗ígenos completo. Em uma realização, uma espécie de Fv de duas cadeias consiste de um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação firme e não covalente. Em uma espécie de Fv de fita única (scFv), um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve podem ser ligados covalentemente por um ligante de peptídeos flexível, de tal forma que as cadeias leve e pesada possam associar-se em uma estrutura "dimérica" análoga à de uma espécie de Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três HVRs de cada domínio variável interagem para definir um local de ligação de抗ígenos sobre a superfície do dímero VH-VL.
10
15 Coletivamente, as seis HVRs conferem especificidade de ligação de抗ígenos ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável isolado (ou metade de um Fv que comprehende apenas três HVRs específicas para um抗ígeno) possui a capacidade de reconhecer e ligar抗ígeno, embora em afinidade mais baixa que o local de ligação completo.

20 O fragmento de Fab contém os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada e também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos de Fab' diferem de fragmentos de Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carbóxi do domínio CH1 de cadeia pesada, que inclui uma ou mais cisteínas da 25 região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a designação do presente para Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes apresenta(m) um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpos $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos na forma de pares de fragmentos de Fab' que contêm cisteínas de

articulação entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos também são conhecidos.

Fragmentos de anticorpos “Fv de fita única” ou “scFv” compreendem os domínios VH e VL de anticorpo, em que esses domínios 5 estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Geralmente, o polipeptídeo de scFv compreende adicionalmente um ligante de polipeptídeo entre os domínios VH e VL, o que permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação de抗ígenos. Para análise de scFv, vide, por exemplo, Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg e 10 Moore eds. (Springer-Verlag, Nova Iorque, 1994), págs. 269-315.

O termo “diacorpos” designa pequenos fragmentos de anticorpos com dois locais de ligação de抗ígenos, que compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia de polipeptídeo (VH-VL). Utilizando um ligante que 15 é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar-se com os domínios complementares de uma outra cadeia e criar dois locais de ligação de抗ígenos. Os diacorpos podem ser bivalentes ou biespecíficos. Os diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, em EP 404.097, WO 20 1993/01161 e Hudson et al, *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003); e Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 6444-6448 (1993). Triacorpos e tetracorpos também são descritos em Hudson et al, *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003).

A expressão “anticorpo monoclonal”, da forma utilizada no presente, designa um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos 25 substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações, tais como mutações de ocorrência natural, que podem estar presentes em quantidades menores. Desta forma, o adjetivo “monoclonal” indica a

característica do anticorpo de não ser uma mistura de anticorpos discretos. Em certas realizações, esse anticorpo monoclonal inclui tipicamente um anticorpo que compreende uma sequência de polipeptídeos que liga um alvo, em que a sequência de polipeptídeos de ligação de alvos foi obtida por meio de um processo que inclui a seleção de uma única sequência de polipeptídeos de ligação de alvo a partir de uma série de sequências de polipeptídeos. O processo de seleção pode ser, por exemplo, a seleção de um único clone dentre uma série de clones, tal como um conjunto de clones de hibridoma, clones de fagos ou clones de DNA recombinantes. Dever-se-á compreender que uma sequência de ligação de alvo selecionada pode ser adicionalmente alterada, por exemplo, para aumentar a afinidade para o alvo, humanizar a sequência de ligação de alvo, aumentar a sua produção em cultivo celular, reduzir a sua imunogenicidade *in vivo*, criar um anticorpo multiespecífico etc., e que um anticorpo que compreende a sequência de ligação de alvo alterada também é um anticorpo monoclonal de acordo com a presente invenção. Ao contrário das preparações de anticorpos policlonais, que incluem tipicamente diferentes anticorpos dirigidos a diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpos monoclonais é dirigido a um único determinante sobre um antígeno. Além da sua especificidade, as preparações de anticorpos monoclonais são vantajosas por não serem tipicamente descontaminadas por outras imunoglobulinas.

O adjetivo “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea e não deve ser considerado como exigindo a produção do anticorpo por meio de qualquer método específico. Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser elaborados, por exemplo, por meio de uma série de métodos, que incluem, por exemplo, o método de hibridoma (tal como em Kohler e Milstein, *Nature*, 256: 495-97 (1975); Hongo

et al, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda edição, 1988); Hammerling et al, em: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, a 5 Patente Norte-Americana nº 4.816.567), tecnologias de exibição de fagos (vide, por exemplo, Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al, *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299-310 (2004); Lee et al, *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (34): 12467-12472 (2004); e Lee et al, *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004) e tecnologias de produção de anticorpos 10 humanos ou similares a humanos em animais que possuem os locais de imunoglobulina humana ou genes, no todo ou em parte, que codificam sequências de imunoglobulina humana (vide, por exemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al, *Proc. 15 Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993); Patentes Norte-Americanas nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 e 5.661.016; Marks et al, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild 20 et al, *Nature Biotechnol.*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.*, 14: 826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Os anticorpos monoclonais do presente incluem especificamente anticorpos “quiméricos”, nos quais uma parte da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados 25 de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes de anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a uma outra classe ou subclasse de anticorpos, bem

como fragmentos desses anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (vide, por exemplo, Patente Norte-Americana nº 4.816.567; e Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 6851-6855 (1984)). Anticorpos químéricos incluem anticorpos PRIMATIZED® em que a região de ligação de 5 antígenos do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido, por exemplo, por meio de imunização de macacos com o antígeno de interesse.

As formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (por exemplo, murinos) são anticorpos químéricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Em uma realização, um anticorpo 10 humanizado é uma imunoglobulina humana (anticorpo receptor), na qual os resíduos de uma HVR do paciente são substituídos por resíduos de uma HVR de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano que possui a especificidade, afinidade e/ou capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos de FR da imunoglobulina 15 humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem no anticorpo doador. Essas modificações podem ser feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá 20 substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos os circuitos hipervariáveis correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá 25 opcionalmente pelo menos uma parte de região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, vide, por exemplo, 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).

Vide também, por exemplo, 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); e as Patentes Norte-Americanas nº 6.982.321 e 7.087.409.

5 "Anticorpo humano" é aquele que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde à de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou foi fabricado utilizando qualquer uma das técnicas de fabricação de anticorpos humanos descritas no presente. Esta definição de anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado que compreende
10 resíduos de ligação de抗ígenos não humanos. Anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando diversos métodos conhecidos na técnica, incluindo bibliotecas de exibição de fagos. Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Também são disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos os métodos descritos
15 em Cole et al, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al, *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991). Vide também van Dijk e van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Anticorpos humanos podem ser preparados por meio da administração do抗ígeno a um animal transgênico que tenha sido modificado para produzir esses anticorpos
20 em resposta a desafio抗ígenico, mas cujos locais endógenos tenham sido impedidos, tais como xenocamundongos imunizados (vide, por exemplo, as Patentes Norte-Americanas nº 6.075.181 e 6.150.584 referentes à tecnologia XENOMOUSE®). Vide também, por exemplo, Li et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 3557-3562 (2006) com referência a anticorpos humanos gerados
25 por meio de tecnologia de hibridomas de células B humanas.

A expressão "região hipervariável", "HVR" ou "HV", da forma utilizada no presente, indica as regiões de um domínio variável de anticorpo que são de sequência hipervariável e/ou formam circuitos definidos

estruturalmente. Geralmente, os anticorpos compreendem seis HVRs; três na VH (H1, H2, H3) e três na VL (L1, L2, L3). Em anticorpos nativos, H3 e L3 exibem a maior diversidade das seis HVRs e acredita-se que H3 desempenhe particularmente um papel exclusivo no fornecimento de especificidade fina a anticorpos. Vide, por exemplo, Xu et al, *Immunity* 13: 37-45 (2000); Johnson e Wu, em *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa NJ, 2003). De fato, anticorpos camelídeos de ocorrência natural que consistem de uma única cadeia pesada são funcionais e estáveis na ausência de cadeia leve. Vide, por exemplo, Hamers-Casterman et al, *Nature* 363: 446-448 (1993); Sheriff et al, *Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996).

Diversas delineações de HVR encontram-se em uso e são englobadas no presente. As Regiões de Determinação de Complementaridade (CDRs) de Kabat baseiam-se na variabilidade de sequências e são as mais comumente utilizadas (Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991)). Chothia refere-se, por sua vez, ao local dos circuitos estruturais (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). As HVRs de AbM representam compromisso entre as HVRs de Kabat e os circuitos estruturais de Chothia e são utilizadas pelo software de modelagem de anticorpos AbM da Oxford Molecular. As HVRs de “ contato” baseiam-se em análise das estruturas de cristais complexas disponíveis. Os resíduos de cada uma destas HVRs são indicados abaixo.

Circ	Kabat	AbM	Chothia	Contato
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)				

Circ	Kabat	AbM	Chothia	Contato
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 HVRs podem compreender “HVRs estendidas” conforme segue: 24-36 ou 24-34 (L1), 46-56 ou 50-56 (L2) e 89-97 ou 89-6 (L3) no VL e 26-35 (H1), 50-65 ou 49-65 (H2) e 93-102, 94-102 ou 95-102 (H3) no VH. Os resíduos de domínios variáveis são numerados de acordo com Kabat et al,
5 acima, para cada uma dessas definições.

Resíduos de “estrutura” ou “FR” são os resíduos de domínios variáveis diferentes dos resíduos de HVR conforme definido no presente.

A expressão “numeração de resíduos de domínio variável como em Kabat” ou “numeração de posição de aminoácidos como em Kabat” e suas variações designa o sistema de numeração utilizado para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve da compilação de anticorpos em Kabat et al, acima. Utilizando este sistema de numeração, a sequência de aminoácidos linear real pode conter mais ou menos aminoácidos correspondentes à redução ou inserção em FR ou HVR do domínio variável.
10 Domínio variável de cadeia pesada pode incluir, por exemplo, um único inserto de aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de H2 e resíduos inseridos (tais como resíduos 82a, 82b, 82c etc. de acordo com Kabat) após o resíduo de FR de cadeia pesada 82. A numeração de resíduos de Kabat pode ser determinada para um dado anticorpo por meio de
15 alinhamento em regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat “padrão”.
20

O sistema de numeração de Kabat é geralmente utilizado com

referência a um resíduo no domínio variável (aproximadamente, resíduos 1 a 107 da cadeia leve e resíduos 1 a 113 da cadeia pesada) (por exemplo, Kabat et al, acima). O "sistema de numeração EU" ou "índice EU" geralmente é utilizado com referência a um resíduo em uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina (tal como o índice EU relatado em Kabat et al, acima). O "índice EU como em Kabat" designa a numeração de resíduos do anticorpo IgG1 EU humano. A menos que indicado em contrário no presente, referências a números de resíduos no domínio variável de anticorpos indicam numeração de resíduos por meio do sistema de numeração de Kabat. A menos que indicado em contrário no presente, referências a números de resíduos no domínio constante de anticorpos indicam numeração de resíduos por meio do sistema de numeração EU (vide, por exemplo, o Pedido Provisório Norte-Americano publicado n° US 2008/0181888 A1, Figuras para numeração de EU).

Anticorpo "amadurecido por afinidade" é aquele com uma ou mais alterações em uma ou mais de suas HVRs, o que resulta em aumento da afinidade do anticorpo para o antígeno, em comparação com um anticorpo parental que não possui essa(s) alteração(ões). Em uma realização, um anticorpo amadurecido por afinidade possui afinidades nanomolares ou até picomolares para o antígeno alvo. Os anticorpos amadurecidos por afinidade podem ser produzidos utilizando certos procedimentos conhecidos na técnica. Marks et al, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992), por exemplo, descrevem amadurecimento por afinidade por meio de troca de domínios VH e VL. A mutagênese aleatória de resíduos de cadeia principal e/ou HVR é descrita, por exemplo, por Barbas et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 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 efetoras" de anticorpos designam as atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc com variação de sequência de aminoácidos) de um anticorpo e variam de acordo com o isotipo do anticorpo. Exemplos de funções efetoras de 5 anticorpos incluem: citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e ligação de C1q; ligação de receptor Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulagem para baixo de receptores da superfície celular (tais como receptor de células B); e ativação de células B.

10 "Afinidade de ligação" geralmente designa a resistência da soma total de interações não covalentes entre um único local de ligação de uma molécula (tal como um anticorpo) e seu parceiro de ligação (tal como um antígeno). A menos que indicado em contrário, da forma utilizada no presente, "afinidade de ligação" designa afinidade de ligação intrínseca que reflete uma 15 interação 1:1 entre membros de um par de ligação (tais como anticorpo e antígeno). A afinidade de uma molécula X para o seu parceiro Y pode geralmente ser representada pela constante de dissociação (Kd). A afinidade pode ser medida por meio de métodos comuns conhecidos na técnica, que incluem os descritos no presente. Anticorpos com baixa afinidade geralmente 20 ligam antígeno lentamente e tendem a dissociar-se rapidamente, enquanto anticorpos com alta afinidade geralmente ligam antígeno mais rapidamente e tendem a permanecer ligados por mais tempo. Uma série de métodos de medição da afinidade de ligação é conhecida na técnica e qualquer um deles pode ser utilizado para os propósitos da presente invenção. Exemplos e 25 ilustrações específicas de realizações de medição da afinidade de ligação encontram-se descritos a seguir.

Em uma realização, "Kd" ou "valor Kd" de acordo com a presente invenção é medido por meio de um teste de ligação de抗ígenos

radiomarcados (RIA) realizado com a versão Fab de um anticorpo de interesse e seu antígeno conforme descrito pelo teste a seguir. A afinidade de ligação de soluções de Fabs para antígeno é medida por meio de equilíbrio de Fab com uma concentração mínima de antígeno marcado com (¹²⁵I) na presença de 5 uma série de titulação de antígeno não marcado e captura em seguida de antígeno ligado com uma placa revestida com anticorpo anti-Fab (vide, por exemplo, Chen et al, *J. Mol. Biol.* 293: 865-881(1999)). Para estabelecer condições para o teste, placas com múltiplas cavidades MICROTITER® (Thermo Scientific) são revestidas por uma noite com 5 µg/ml de anticorpo anti- 10 Fab de captura (Cappel Labs) em 50 mM de carbonato de sódio (pH 9,6) e bloqueadas em seguida com albumina de soro bovino a 2% (p/v) em PBS por duas a cinco horas à temperatura ambiente (cerca de 23 °C). Em uma placa não adsorvente (Nunc nº 269620), 100 pM ou 26 pM de antígeno [¹²⁵I] são misturados com diluições em série de um Fab de interesse (tal como 15 consistente com a determinação do anticorpo anti-VEGF, Fab-12, em Presta et al, *Cancer Res.* 57: 4593-4599 (1997)). O Fab de interesse é incubado em seguida por uma noite; entretanto, a incubação pode prosseguir por um período mais longo (tal como 65 horas) para garantir que o equilíbrio seja atingido. Em seguida, as misturas são transferidas para a placa de captura 20 para incubação à temperatura ambiente (tal como por uma hora). A solução é removida em seguida e a placa é lavada por oito vezes com 0,1% TWEEN 20® em PBS. Após a secagem das placas, adiciona-se 150 µl/cavidade de cintilante (MICROSCINT-20®; Packard) e as placas são contadas em um contador gama TOPCOUNT® (Packard) por dez minutos. Concentrações de 25 cada Fab que geram 20% ou menos de ligação máxima são selecionadas para uso em testes de ligação competitiva.

De acordo com uma outra realização, o Kd ou valor Kd é medido utilizando testes de ressonância de plasma de superfície empregando

BIACORE® 2000 ou BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway NJ) a 25 °C com lascas de antígeno CM5 imobilizado a cerca de dez unidades de resposta (RU). Resumidamente, lascas de biosensores de dextran carboximetilado (CM5, BIACORE Inc.) são ativadas com cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodi-imida (EDC) e *N*-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. Antígeno é diluído com 10 mM de acetato de sódio, pH 4,8, em 5 µg/ml (cerca de 0,2 µM) antes da injeção em velocidade de fluxo de 5 µl/minuto para atingir cerca de dez unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Após a injeção de antígeno, 1 M de etanolamina é injetado para bloquear grupos não reagidos. Para medições cinéticas, diluições seriais em duas vezes de Fab (0,78 nM a 500 nM) são injetadas em PBS com 0,05% tensoativo TWEEN 20® (PBST) a 25 °C sob velocidade de fluxo de cerca de 25 µl/min. Taxas de associação (k_{on}) e taxas de dissociação (k_{off}) são calculadas utilizando um modelo de ligação Langmuir um a um simples (Software de Avaliação BIACORE® versão 3.2) por meio de configuração simultânea dos sensogramas de associação e dissociação. A constante de dissociação de equilíbrio (K_d) é calculada como razão k_{off}/k_{on} . Vide, por exemplo, Chen et al, *J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999). Caso a taxa de associação exceda $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por meio do teste de ressonância de plasma de superfície acima, a taxa de associação pode ser determinada utilizando um método de resfriamento fluorescente que mede o aumento ou a redução da intensidade de emissão de fluorescência (excitação = 295 nm; emissão = 340 nm, passagem de faixa de 16 nm) a 25 °C de 20 nM de anticorpo antiantígeno (forma de Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes de antígeno conforme medido em um espectrômetro, tal como um espectrômetro equipado com fluxo de parada (Aviv Instruments) ou um espectrofotômetro SLM-AMINCO® série 8000 (ThermoSpectronic) com uma cubeta agitada.

Uma “taxa de ligação”, “taxa de associação” ou “ k_{on} ” de acordo

com a presente invenção pode também ser determinada conforme descrito acima utilizando um sistema BIACORE® 2000 ou BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway NJ).

“Distúrbio” é qualquer condição ou doença que se beneficiaria do tratamento com uma composição ou método de acordo com a presente invenção. Isso inclui distúrbios agudos e crônicos que incluem as condições patológicas que predispõem o mamífero ao distúrbio em questão. Exemplos não limitadores de distúrbios a serem tratados no presente incluem condições tais como câncer.

As expressões “distúrbio proliferativo celular” e “distúrbio proliferativo” designam distúrbios que são associados a algum grau de proliferação celular anormal. Em uma realização, o distúrbio proliferativo celular é câncer.

“Tumor”, da forma utilizada no presente, indica toda proliferação e crescimento de células neoplásticas, sejam elas malignas ou benignas, e todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos. As expressões “câncer”, “canceroso”, “distúrbio proliferativo celular”, “distúrbio proliferativo” e “tumor” não são mutuamente exclusivas conforme indicado no presente.

Os termos “câncer” e “canceroso” designam ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pela proliferação/crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, mas sem limitações, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais específicos desses cânceres incluem carcinoma de células escamosas, câncer do pulmão de células pequenas, câncer do pulmão não de células pequenas, adenocarcinoma do pulmão, carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer da cervical, câncer do ovário, câncer do fígado, câncer da bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer do cólon,

câncer colorretal, carcinoma endométrico ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, câncer dos rins, câncer do fígado, câncer da próstata, câncer da vulva, câncer da tireoide, carcinoma hepático, câncer gástrico, melanoma e vários tipos de câncer da cabeça e do pescoço. A desregulagem de 5 angiogênese pode gerar muitos distúrbios que podem ser tratados por meio de composições e métodos de acordo com a presente invenção. Esses distúrbios incluem condições neoplásticas e não neoplásticas. As neoplásticas incluem, mas sem limitações, as descritas abaixo. Distúrbios não neoplásticos incluem, mas sem limitações, hipertrofia indesejada ou aberrante, artrite, artrite 10 reumatoide (RA), psoriase, placas psoriáticas, sarcoidose, arteriosclerose, placas arterioscleróticas, retinopatias diabéticas e outras proliferativas que incluem retinopatia de prematuros, fibroplasia retrógrada, glaucoma neovascular, degeneração macular relativa à idade, edema macular diabético, neovascularização da córnea, neovascularização de enxerto da córnea, 15 rejeição de enxerto da cornea, neovascularização da retina/coroidal, neovascularização do ângulo (rubeose), doença neovascular ocular, restenose vascular, má formação arteriovenosa (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias da tireoide (incluindo mal de Grave), transplante de tecidos da córnea e outros, inflamações crônicas, inflamações do pulmão, 20 lesões agudas do pulmão/ARDS, sepsia, hipertensão pulmonar primária, efusões pulmonares malignas, edema cerebral (tal como associado a apoplexia aguda, lesões fechadas da cabeça e trauma), inflamações sinoviais, formação de pannus em RA, miosite ossificante, formações ósseas hipertróficas, osteoartrite (OA), ascite refratária, doença do ovário policístico, endometriose, 25 terceiro espaçamento de doenças de fluidos (pancreatite, síndrome de compartimentos, queimaduras, doenças intestinais), fibroides uterinas, parto prematuro, inflamações crônicas tais como IBD (mal de Crohn e colite ulcerativa), rejeição de aloenxertos renais, doença do intestino inflamado,

síndrome nefrótica, crescimento de massa de tecidos indesejada ou aberrante (não de câncer), juntas hemofílicas, cicatrizes hipertróficas, inibição do crescimento capilar, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogênico, fibroplasia retrolenta, escleroderma, tracoma, adesões vasculares, sinovite, 5 dermatite, pré-eclâmpsia, ascite, efusão do pericárdio (tal como a associada a pericardite) e efusão pleurica.

O termo “leucemia” designa uma doença aguda ou crônica caracterizada por aumento anormal do número de glóbulos brancos do sangue (leucócitos) em tecidos hemopoiéticos, outros órgãos e, frequentemente, no 10 sangue. Leucemias incluem, mas sem limitações, leucemia linfobástica aguda (ALL), incluindo leucemia linfoblástica aguda de linhagem T (T-ALL), bem como outras leucemias linfocíticas; linfoma/leucemia de células T em adultos; leucemia mieloide (mielógena) crônica (CML), leucemia mieloide (mielógena) 15 aguda (AML) e outras leucemias granulocíticas; e leucemias de alteração de linhagem.

A expressão “leucemia de células T” designa uma leucemia caracterizada por aumento anormal do número de linfoblastas de linhagem T ou linfócitos T.

A expressão “leucemia progenitora de células T” designa uma 20 leucemia caracterizada por aumento anormal do número de linfoblastas de linhagem T.

“Câncer sensível a GSI” é câncer (tal como leucemia) que reage a um inibidor de gama secretase ou que reagiria a um inibidor de gama secretase se tratado com ele.

25 Um câncer que “reage” a um agente terapêutico é aquele que exibe redução significativa da progressão de tumor ou câncer, incluindo, mas sem limitações, (1) inibição, até certo ponto, do crescimento de tumores, incluindo a redução da velocidade e suspensão completa do crescimento; (2)

redução do número de células de tumor ou câncer; (3) redução do tamanho do tumor; (4) inibição (ou seja, redução, redução da velocidade ou parada completa) da infiltração de células cancerosas em tecidos e/ou órgãos periféricos adjacentes; e/ou (5) inibição (ou seja, redução, redução da velocidade ou parada completa) da metástase.

Um câncer que “não reage a um antagonista específico de Notch1” é um câncer que não reage ao tratamento com um antagonista específico de Notch1 (na ausência de qualquer outro antagonista de Notch, ou seja, antagonista Notch2, Notch3 ou Notch4) ou que não reagiria a esse tratamento, se fornecido.

Da forma utilizada no presente, “tratamento” (e variações tais como “tratar” ou “tratando”) indica intervenção clínica em uma tentativa de alterar o curso natural do indivíduo ou da célula sendo tratada e pode ser realizado para profilaxia ou durante o transcurso de patologia clínica. Os efeitos desejáveis de tratamento incluem a prevenção da ocorrência ou reincidência da doença, alívio dos sintomas, redução de quaisquer consequências patológicas diretas ou indiretas da doença, prevenção de metástase, redução da velocidade de progresso da doença, melhoria ou redução do estado doente e remissão ou melhor prognóstico. Em algumas realizações, os anticorpos de acordo com a presente invenção são utilizados para retardar o desenvolvimento de uma doença ou distúrbio ou reduzir o progresso de uma doença ou distúrbio.

Um “indivíduo” ou “paciente” é um vertebrado. Em certas realizações, o vertebrado é um mamífero. Mamíferos incluem, mas sem limitações, animais de fazenda (tais como vacas), animais esportivos, animais de estimação (tais como gatos, cães e cavalos), primatas, camundongos e ratos. Em certas realizações, o mamífero é um ser humano.

A expressão “formulação farmacêutica” designa uma preparação

que se encontra em uma forma que permite que a atividade biológica do ingrediente ativo seja efetiva e que não contém componentes adicionais que são inaceitavelmente tóxicos para um paciente a quem a formulação seria administrada. Essas formulações podem ser estéreis.

5 "Quantidade eficaz" designa uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado terapêutico ou profilático desejado.

II. REALIZAÇÕES DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se especificamente, em parte, à caracterização de diferentes classes de T-ALL. Uma classe de T-ALL é sensível a tratamento com GSI, que é um inibidor de todos os Notch, e também é sensível a tratamento com um antagonista específico de Notch1, o que indica que Notch1 dirige especificamente essa classe de T-ALL. Uma outra classe de T-ALL é sensível ao tratamento com GSI, mas insensível (ou seja, resistente) a tratamento com um antagonista específico de Notch1, o que indica que um receptor de Notch adicional ou alternativo pode dirigir esta classe de T-ALL. Conforme exibido no presente, os inventores revelam que esta última classe de T-ALL é parcialmente sensível a tratamento com um antagonista específico de Notch3 e ainda mais sensível a uma combinação de um antagonista específico de Notch1 e um antagonista específico de Notch3. Estes resultados sugerem um papel de Notch1 e Notch3 em leucemias, particularmente leucemias de células T e progenitoras de células T tais como T-ALL.

A. MÉTODOS DE TRATAMENTO

1. TRATAMENTO DE CÂNCER COM UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE NOTCH3,

25 ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO COM UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE NOTCH1

Em vários aspectos da presente invenção, são fornecidos métodos de tratamento de um câncer sensível a GSI, em que o método compreende a administração a um paciente que possui esse câncer de uma

quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch3. Em certas realizações, o câncer sensível a GSI é leucemia. Em certas realizações, o câncer sensível a GSI não reage a um antagonista específico de Notch1; o câncer possui, por exemplo, níveis significativamente mais altos de Notch3 ativado e/ou o câncer possui níveis reduzidos ou ausentes de Notch1 ativado. 5 Em uma realização adicional, o método compreende ainda a administração de uma quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch1. Estes e outros aspectos da presente invenção são descritos abaixo.

Em um aspecto específico da presente invenção, é fornecido um 10 método de tratamento de leucemia sensível a GSI e não reage a um antagonista específico de Notch1, em que o método compreende a administração a um paciente que possui esse essa leucemia de uma quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch3.

Leucemia sensível a GSI pode ser identificada de diversas 15 formas. Um paciente que possui leucemia pode ser tratado, por exemplo, com GSI para determinar se a leucemia é sensível a GSI ou não. Esse GSI pode incluir qualquer GSI que iniba significativamente receptores de Notch. Esse GSI inclui, mas sem limitações, t-butil éster de N-[N-(3,5-difluorofenacetyl)-L-alanil]-S-fenilglicina (DAPT); dibenzazepina; MK-0752 (Merck); o tripeptídeo z- 20 Leu-Leu-Nle-CHO (Curry et al, *Oncogene* 24: 6333-6344); e cbz-IL-CHO (Weijzen et al, *Nat. Med.* 8: 979-986, 2002). Observa-se, entretanto, que um paciente que possui leucemia não necessita haver sido tratado com GSI para determinar se a leucemia é sensível a GSI ou não. Podem ser empregados outros métodos. Células de leucemia removidas do paciente podem ter 25 determinada, por exemplo, a proliferação ou sobrevivência celular na presença de GSI, tal como qualquer uma das relacionadas acima. Em um exemplo adicional, células leucêmicas removidas do paciente podem ser examinadas para determinar aumento da sinalização de Notch por um ou mais receptores

de Notch, o que preveria que as células sensíveis a GSI. As células podem ter determinada, por exemplo, a presença de um receptor de Notch ativado, sobre-expresso ou que sofreu mutação. Métodos similares aos descritos acima podem ser utilizados para determinar se qualquer câncer é sensível a GSI.

5 Pode-se identificar leucemia (tal como leucemia sensível a GSI) como não reagindo a um antagonista específico de Notch por diversas formas. Um paciente que possui leucemia pode ser tratado, por exemplo, com um antagonista específico de Notch1 para determinar se a leucemia reage ou não ao antagonista específico de Notch1. Em certas realizações, o antagonista específico de Notch1 ao qual uma leucemia não reage é um anticorpo antagonista anti-Notch1. Em uma dessas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo que se liga ao domínio extracelular de Notch1 e efetua sinalização de Notch1 reduzida. Em uma dessas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo NRR anti-Notch1. Anticorpos 10 NRR anti-Notch1 incluem, mas sem limitações, quaisquer dos anticorpos NRR anti-Notch1 descritos no Pedido de Patente Publicado Norte-Americano n° US 2009/0081238 A1, que é expressamente incorporado integralmente ao presente como referência. Esses anticorpos incluem, mas sem limitações, anticorpos NRR anti-Notch1 que se ligam a NRR Notch1 com afinidade de ≤ 15 0,1 μM; anticorpos NRR anti-Notch1 que se ligam a LNR-A, LNR-B e HD-C do NRR Notch1; ou uma combinação dos acima. Exemplos de anticorpos NRR anti-Notch1 incluem, mas sem limitações, anticorpos A, A-1, A-2 e A-3, conforme descrito em US 2009/0081238 A1, ou anticorpos que compreendem as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de CDRs de um anticorpo de 20 anticorpo A, A-1, A-2 e A-3. Em uma outra dessas realizações, um anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo anti-Notch1 que se liga a uma ou mais repetições similares a EGF de Notch1. Exemplos desses anticorpos são descritos na Patente Internacional n° WO 2008/091641. Em certas realizações, 25

um anticorpo anti-Notch1 que se liga a uma ou mais repetições similares a EGF de Notch1 efetua sinalização de Notch1 reduzida por meio de bloqueio significativo da ligação de ligante a Notch1.

Observa-se, entretanto, que um paciente que possui leucemia 5 não necessita haver sido tratado com um antagonista específico de Notch1 para determinar se a leucemia não reage a um antagonista específico de Notch1. Podem ser empregados outros métodos. Células leucêmicas removidas do paciente podem ser testadas, por exemplo, para determinar ativação de Notch1 ausente ou reduzida ou, em certas realizações, a presença 10 de Notch1 do tipo selvagem, o que preveria que a leucemia não reage a um antagonista específico de Notch1. As células podem ser avaliadas, por exemplo, para determinar sinalização de Notch1 ausente ou reduzida por meio da determinação de transcrição ausente ou reduzida de genes alvo Notch1, tais como Hey1 e Hey2. Em um exemplo adicional, as células podem ser 15 avaliadas para determinar sinalização de Notch1 ausente ou reduzida por meio da detecção de níveis ausentes ou reduzidos de uma forma ativada de Notch1, utilizando, por exemplo, um anticorpo específico para Notch1 ativado tal como Val1744 anti-Notch1 ativo (disponível comercialmente por meio da Cell Signaling Technologies). Em certas realizações, uma célula comparadora 20 apropriada (controle positivo) pode ser uma célula leucêmica que reage a um antagonista específico de Notch1, tal como uma célula leucêmica na qual o processo de Notch1 é ativado. Essa célula comparadora pode incluir, por exemplo, uma célula T-ALL na qual se sabe que Notch1 é sobre-expresso, sofreu mutação (tal como que possui uma mutação ativadora de Notch1) ou é 25 ativado (tal como ativado constitutivamente), como uma célula HPB-ALL. Caso células leucêmicas removidas de um paciente contenham níveis ausentes ou significativamente reduzidos de Notch1 ativado em comparação com a célula comparadora, presume-se que a leucemia do paciente não reaja a antagonista

específico de Notch1.

Células leucêmicas podem também ser avaliadas para determinar a ativação de Notch3, o que indica que o processo de Notch3 é ativado e prevê-se, portanto, que a leucemia não reaja a antagonista específico de Notch1. Em uma realização, células leucêmicas podem ser examinadas para determinar a presença de Notch3 sobre-expresso, ativado ou que sofreu mutação. Em certas realizações, uma célula comparadora apropriada (controle negativo) para fins de determinação da situação de ativação de Notch3 pode ser uma célula leucêmica que reage a um antagonista específico de Notch1, tal como uma célula leucêmica na qual o processo de Notch1 é ativado. Essa célula comparadora pode incluir, por exemplo, uma célula T-ALL na qual se sabe que Notch1 é sobre-expresso, sofreu mutação ou é ativado, tal como uma célula HPB-ALL. Nessa célula, não se espera que Notch3 seja significativamente ativado. Caso células leucêmicas removidas de um paciente contenham níveis significativamente mais altos de Notch3 ativado em comparação com a célula comparadora, portanto, presume-se que a leucemia do paciente reaja a antagonista específico de Notch1. Em algumas outras realizações, uma célula comparadora apropriada (controle positivo) pode ser uma célula leucêmica na qual se sabe que Notch3 é sobre-expresso, sofreu mutação ou é ativado, tal como uma célula TALL-1. Nessa célula, espera-se que Notch3 possua níveis significativamente mais altos de Notch3 ativado. Caso células leucêmicas removidas de um paciente contenham níveis comparáveis de Notch3 ativado em comparação com a célula comparadora, presume-se que a leucemia do paciente não reaja a antagonista específico de Notch1. Métodos similares aos descritos acima podem ser utilizados para determinar se o câncer não reage a um antagonista específico de Notch1.

Uma ferramenta útil de determinação da situação de ativação de Notch3 é o novo anticorpo anti-ICD Notch3 descrito nos Exemplos, que se liga

a ICD Notch3 ativado.

Em certas realizações, o antagonista específico de Notch3 que é administrado é um anticorpo antagonista anti-Notch3. Em uma dessas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch3 é um anticorpo que se liga ao domínio extracelular de Notch3 e efetua sinalização de Notch3 reduzida. Em uma dessas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch3 é um anticorpo NRR anti-Notch3. Anticorpos NRR anti-Notch3 incluem, mas sem limitações, quaisquer dos anticorpos NRR anti-Notch3 descritos no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº US 2008/0226621 A1, que é expressamente incorporado integralmente ao presente como referência. Esses anticorpos incluem, mas sem limitações, anticorpos NRR anti-Notch3 que se ligam aos domínios LNR-A e HD-C de NRR Notch3. Exemplos de anticorpos NRR anti-Notch3 são anticorpos monoclonais 256A-4 e 256A-8, conforme descrito em US 2008/0226621 A1, e suas formas humanizadas, bem como anticorpos NRR anti-Notch3 que compreendem as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de CDRs do anticorpo 256A-4 ou 256A-8. Em uma outra dessas realizações, um anticorpo antagonista anti-Notch3 é um anticorpo anti-Notch3 que se liga a uma ou mais repetições similares a EGF de Notch3. Exemplos desses anticorpos são descritos em Li et al, *J. Biol. Chem.* 283: 8046-8054, 2008. Em certas realizações, um anticorpo anti-Notch3 que se liga a uma ou mais repetições similares a EGF de Notch3 efetua sinalização de Notch3 reduzida por meio de bloqueio significativo da ligação de ligante a Notch3.

Em certas realizações, a leucemia é uma leucemia de células T. Em certas realizações, a leucemia de células T é uma leucemia progenitora de células T. Em certas realizações, a leucemia progenitora de células T é T-ALL.

Em realizações adicionais, é fornecido um método de tratamento de um câncer sensível a GSI e não reage a um antagonista específico de

Notch1, em que o método compreende a administração a um paciente que possui esse câncer de uma quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch3 e que compreende adicionalmente a administração a esse paciente de uma quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch1. Em certas realizações, o câncer sensível a GSI é leucemia sensível a GSI. Em certas realizações, o antagonista específico de Notch1 a ser administrado é um anticorpo antagonista anti-Notch1. Em uma dessas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo que se liga ao domínio extracelular de Notch1 e efetua sinalização de Notch1 reduzida. Em uma dessas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo NRR anti-Notch1. Anticorpos NRR anti-Notch1 incluem, mas sem limitações, quaisquer dos anticorpos NRR anti-Notch1 descritos no Pedido de Patente Publicado Norte-Americano nº US 2009/0081238 A1, que é expressamente incorporado ao presente como referência. Esses anticorpos incluem, mas sem limitações, anticorpos NRR anti-Notch1 que se ligam a NRR Notch1 com afinidade de $\leq 0,1 \mu\text{M}$; anticorpos NRR anti-Notch1 que se ligam a LNR-A, LNR-B e HD-C do NRR Notch1; ou uma combinação dos acima. Exemplos de anticorpos NRR anti-Notch1 incluem, mas sem limitações, anticorpos A, A-1, A-2 e A-3, conforme descrito em US 2009/0081238 A1, ou anticorpos que compreendem as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de CDRs de um anticorpo selecionado a partir de anticorpo A, A-1, A-2 e A-3. Em uma outra dessas realizações, o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo anti-Notch1 que se liga a uma ou mais repetições similares a EGF de Notch1. Exemplos desses anticorpos são descritos na Patente Internacional nº WO 2008/091641. Em certas realizações, um anticorpo anti-Notch1 que se liga a uma ou mais repetições similares a EGF de Notch1 efetua sinalização de Notch1 reduzida por meio de bloqueio

significativo da ligação de ligante a Notch1.

2. TRATAMENTO DE LEUCEMIA COM UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE NOTCH1

Aspectos adicionais da presente invenção são baseados, em parte, na identificação de uma classe de T-ALL sensível a GSI e também reage a um antagonista específico de Notch1, mas não reage a um antagonista específico de Notch3, o que indica que Notch1 dirige o T-ALL. Em vários aspectos da presente invenção, são fornecidos métodos de tratamento de um câncer sensível a GSI, em que o método compreende a administração a um paciente que possui esse câncer de uma quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch1. Em certas realizações, o câncer sensível a GSI é leucemia. Em certas realizações, o câncer sensível a GSI não reage a um antagonista específico de Notch3; o câncer possui, por exemplo, níveis ausentes ou reduzidos de Notch3 ativado (tal como em comparação com uma célula comparadora que reage a um antagonista específico de Notch3) e/ou possui níveis significativamente mais altos de Notch1 ativado (tal como em comparação com uma célula comparadora que não reage a um antagonista específico de Notch1).

Em certas realizações, a leucemia pertence a uma classe de leucemias caracterizadas por sensibilidade a GSI e sensibilidade a um antagonista específico de Notch1. Em uma realização, a leucemia é uma leucemia de células T. Em uma dessas realizações, a leucemia de células T é uma leucemia progenitora de células T. Em uma dessas realizações, a leucemia de células T é T-ALL. Em uma outra realização, a leucemia é caracterizada por uma mutação de ativação de Notch1.

Em certas realizações, um antagonista específico de Notch1 é qualquer um dos fornecidos acima. Em realizações adicionais, um antagonista específico de Notch3 é qualquer um dos fornecidos acima.

B.COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A presente invenção fornece ainda um anticorpo que liga ICD Notch3 ahumano ativado. Em uma realização, o anticorpo liga-se à sequência de peptídeos VMVARRKREHSTLW (SEQ ID N° 4). Em uma realização, o anticorpo é monoclonal. Em uma realização, o anticorpo é policlonal. As 5 realizações acima podem estar presentes isoladamente ou em combinação.

Esse anticorpo é útil em métodos de diagnóstico, por exemplo, para identificar populações de pacientes apropriadas para tratamento com um antagonista específico de Notch3, conforme descrito acima.

10 Consequentemente, em certas realizações, é fornecido um método de identificação de câncer apropriado para tratamento com um antagonista de Notch3, em que o método compreende a determinação se Notch3 é ativado no câncer. Em uma realização, o câncer é um câncer sensível a GSI. Em uma outra realização, o câncer é leucemia. Em uma outra realização, a leucemia é 15 uma leucemia de células T. Em uma dessas realizações, a leucemia de células T é uma leucemia progenitora de células T. Em uma dessas realizações, a leucemia de células T é T-ALL.

Em realizações adicionais, a determinação se Notch3 é ativado no câncer compreende o contato de uma amostra do câncer com um anticorpo 20 que liga ICD Notch3 ativado e a determinação se níveis significativamente mais altos de Notch3 ativado (conforme refletido por níveis de ICD Notch3 ativado) estão presentes, em que a presença de níveis significativamente mais altos de Notch3 ativado indica que o câncer é apropriado para tratamento com um antagonista de Notch3. Para determinar se níveis significativamente mais altos 25 de Notch3 ativado estão presentes na amostra, um comparador apropriado (controle positivo) pode ser, por exemplo, uma amostra de câncer conhecida por reagir a um antagonista de Notch3. Caso a amostra de "teste" e a amostra de "controle" contenham níveis comparáveis de Notch3 ativado, o câncer do

qual foi obtida a amostra de "teste" é apropriado para tratamento com um antagonista de Notch3. Um outro comparador apropriado (controle negativo) pode ser, por exemplo, uma amostra de câncer que não reage a um antagonista de Notch3. Caso a amostra de "teste" contenha níveis 5 comparáveis de Notch3 ativado em comparação com a amostra controle, o câncer do qual foi obtida a amostra de "teste" é apropriado para tratamento com um antagonista de Notch3.

Em certas realizações dos métodos acima, um antagonista de Notch3 é um antagonista específico de Notch3. Em certas realizações, um 10 antagonista específico de Notch3 é qualquer um dos discutidos acima.

III. EXEMPLOS

A.T-ALL ENQUADRA-SE EM TRÊS CLASSES

Estudos anteriores demonstraram que as linhagens de células T-ALL podem ou não ser sensíveis a tratamento com GSI. Certas linhagens de 15 células T-ALL, por exemplo, são resistentes a GSI, apesar da expressão de mutações Notch1 de ativação, possivelmente devido à ativação de um processo não de Notch, tal como um processo que elimine a necessidade de Notch (vide, por exemplo, Palomero et al, *Nat. Med.* 13: 1203-1210, 2007). Em um estudo, entretanto, cinco de trinta linhagens de células T-ALL foram 20 sensíveis a GSI, o que demonstra suspensão do ciclo celular em resposta a GSI (vide Weng et al, *Science* 306: 269-271, 2004). Os estudos relatados abaixo exploraram adicionalmente a reação de linhagens de células T-ALL não apenas a GSI, mas também a antagonistas específicos de Notch1 e Notch3.

Três classes de T-ALL foram caracterizadas com base na sua 25 sensibilidade a GSI e a um antagonista específico de Notch1. O antagonista específico de Notch1 utilizado nos estudos a seguir foi o anticorpo NRR anti-Notch1, "Anticorpo A-2", cujo isolamento e caracterização são discutidos no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº US 2009/0081238 A1. Por

conveniência, “anticorpo A-2” é denominado no presente “anti-NRR1” e também é denominado “α-Notch1”, “aNotch1” ou “α-N1” nas figuras.

As Figuras 3 a 5 apresentam a classificação de três linhagens de células T-ALL humanas representativas. Estas linhagens celulares incluem a linhagem de células P-12 Ichikawa, a linhagem de células HPB-ALL e a linhagem de células TALL-1. As células foram cultivadas por oito dias em condições de controle (DMSO isolado (veículo para DAPT) ou anti-gD (anticorpo controle de isótipos)); na presença do inibidor de gama-secretase, DAPT (5 µM); ou na presença de anti-NRR1 (5 µg/ml). As células foram fixadas, manchadas com iodeto de propídio e preparadas para FACS para analisar a situação de ciclo celular, de acordo com procedimentos padrão. A sensibilidade ao crescimento foi determinada por meio de exame se um dado tratamento causou aumento do percentual de células em G0/G1 com redução correspondente do percentual de células em S/G2/M. Os resultados demonstram que as células P-12 Ichikawa são resistentes a DAPT e anti-NRR1 (Figuras 3A a 3D), sem diferença significativa da situação do ciclo celular entre células tratadas com DAPT, tratadas com anti-NRR1 e controle (tratadas com DMSO e anti-IgD). As células HPB-ALL são sensíveis a DAPT e anti-NRR1 (Figuras 4A a 4D), com células tratadas com DAPT e anti-NRR1 que exibem cerca de 78% e 76% de células em G0/G1, respectivamente, em comparação com cerca de 33 a 34% das células controle. As células TALL-1 são sensíveis a DAPT, mas resistentes a anti-NRR1 (Figuras 5A a 5D), com cerca de 87% de células tratadas com DAPT em G0/G1, em comparação com cerca de 55% de células tratadas com anti-NRR1 e cerca de 53 a 54% de células controle. Observa-se que Notch1 não sofre mutação em células TALL-1. Estudos adicionais revelaram que uma quarta linhagem celular, CCRF-CEM, caiu na mesma classe de células P-12 Ichikawa (ou seja, resistentes a GSI e anti-NRR1) (dados não exibidos e Figura 10).

Conforme exibido na Figura 6, as medições do tamanho de células refletem estas três classes de T-ALL. A linhagem de células P-12 Ichikawa, a linhagem de células HPB-ALL e a linhagem de células TALL-1 foram cultivadas por cerca de uma semana em condições de controle (DMSO isolado (veículo para DAPT) ou anti-gD (anticorpo controle de isotipos)); na presença do inibidor de gamassecretase, DAPT (5 μ M); ou na presença de anti-NRR1 (5 μ g/ml). O diâmetro celular foi medido utilizando um contador de células (Vi-Cell, Beckman Coulter). De forma consistente com os estudos de inibição do crescimento, a linhagem P-12 Ichikawa é resistente a DAPT e anti-NRR1, conforme indicado por meio de diâmetro celular relativamente consistente entre as células controle e tratadas. HPB-ALL é sensível a DAPT e anti-NRR1, conforme indicado pelo tamanho significativamente menor de células tratadas com esses agentes, respectivamente. TALL-1 é sensível a DAPT, mas resistente a anti-NRR1, conforme indicado pelo tamanho significativamente menor de células tratadas com DAPT, mas não com agentes anti-NRR1 ou controle. Estes resultados são consistentes com os estudos de crescimento descritos acima.

Conforme exibido na Figura 7, as medições da apoptose também refletem estas três classes de T-ALL. A linhagem celular de P-12 Ichikawa, a linhagem de células HPB-ALL e a linhagem de células TALL-1 foram tratadas conforme descrito acima para a Figura 6. As células foram analisadas por meio de FACS, com manchas para 7-AAD (marcador da morte celular) sobre o eixo x da Figura 7 e mancha para Anexina V (marcador para apoptose) sobre o eixo y da Figura 7. Com base no percentual de células na população positiva dupla, tratamento com DAPT ou anti-NRR1 aumenta a morte de células apoptóticas em células HPB-ALL. Por outro lado, células P-12 Ichikawa são resistentes aos dois tratamentos, enquanto células TALL-1 são sensíveis a DAPT mas não a anti-NRR1. Estes resultados são consistentes com os estudos de crescimento

e medições do diâmetro celular descritos acima.

Conforme exibido na Figura 8, os resultados de um teste de proliferação celular também refletem estas três classes de T-ALL. A linhagem celular P-12 Ichikawa, a linhagem de células HPB-ALL e a linhagem de células

5 TALL-1 foram tratadas conforme descrito acima para a Figura 6. As células foram analisadas por meio de FACS utilizando manchas Ki-67 para marcar a proliferação (quadro esquerdo). Uma alteração no pico de FACS para a esquerda indica manchas mais baixas para Ki-67 e redução da proliferação, enquanto, por outro lado, uma alteração do pico de FACS para a direita indica manchas mais altas para Ki-67 e aumento da proliferação. Com base neste
10 teste de proliferação, HPB-ALL foi sensível a DAPT e anti-NRR1, TALL-1 foi sensível a DAPT mas não a anti-NRR1 e células P-12 Ichikawa foram resistentes a ambos. Novamente, estes resultados são consistentes com os dos outros testes descritos acima, bem como medições da apoptose exibidas
15 no quadro direito da Figura 8. Aquele quadro exibe contagens celulares para células negativas duplas (não apoptóticas) de Anexina V/7-AAD. Baixas contagens celulares (tais como baixos números de células negativas duplas (não apoptóticas) de Anexina V/7-ADD) indicam aumento da apoptose que, por sua vez, correlaciona-se com redução da proliferação no quadro esquerdo.

20 B.CÉLULAS TALL-1 SENSÍVEIS A GSI RESISTENTES A ANTI-NRR1 SÃO

PARCIALMENTE SENSÍVEIS A ANTI-NRR3

Conforme descrito acima, duas das três classes de T-ALL, representadas por HPB-ALL e TALL-1, são ambas sensíveis a GSI, mas diferem pelo fato de que o primeiro é sensível a anti-NRR1, enquanto o último

25 não o é. Como a sensibilidade a GSI sugere um papel para um ou mais receptores de Notch, perguntamos se um receptor de Notch além de Notch1 ou alternativamente a ele desempenha papel na resistência da última classe de T-ALL a NRR anti-Notch1. Para abordar esta questão, células CCRF-CEM,

células HPB-ALL e células TALL-1 foram tratadas conforme descrito para as Figuras 3 a 5, exceto pela inclusão de um antagonista específico de Notch3 a 10 µg/ml em um subconjunto dos tratamentos para testar se o crescimento dependeu da sinalização de Notch3. O antagonista específico de Notch3 utilizado nestes estudos foi anticorpo monoclonal anti-Notch3 humano de camundongo 256A-4, cujo isolamento e caracterização são discutidos no Pedido de Patente Norte-Americano publicado n° US 2008/0226621 A1. Por conveniência, 256A-4 é denominado no presente “anti-NRR3” e também é denominado “α-N3” nas figuras.

Os resultados indicam que o crescimento de TALL-1 é parcialmente sensível a anti-NRR3 e ainda mais sensível a anti-NRR1 mais anti-NRR3 (vide as Figuras 9A a 9F), o que sugere que a sinalização através de Notch3 bem como Notch1 explica por quê a linhagem é sensível a DAPT mas não a anti-NRR1. Especificamente, cerca de 83% das células TALL-1 estavam em G0/G1 após tratamento com DAPT, em comparação com cerca de 53-54% para as células controle (tratadas com DMSO ou α-gD). Tratamento com anti-NRR3 resultou em cerca de 61% das células em G0/G1 e a adição de anti-NRR1 aumentou esse número para cerca de 68%. Por outro lado, CCRF-CEM parece resistente a todos os tratamentos testados (Figuras 10A a 10F), cada qual exibindo cerca de 52 a 57% das células em G0/G1. HBP-ALL parece sensível a tratamento com DAPT e anti-NRR1 (cada qual exibindo cerca de 67% das células em G0/G1), mas não a tratamento anti-NRR3 (que exibe cerca de 37% de células em G0/G1) (Figuras 11A a 11F).

Os resultados do experimento acima nas Figuras 9B a 9F são novamente plotados na Figura 14. Os cultivos de células TALL-1 começaram com cerca de 5×10^5 células/ml e o eixo y é o número de células/ml, em milhões de células, após tratamento sob as condições indicadas e conforme descrito para as Figuras 9B a 9F. A Figura 14 demonstra que anti-NRR1 e anti-

NRR3 resultaram individualmente em contagens celulares mais baixas. A combinação de anti-NRR1 e anti-NRR3 apresentou, entretanto, efeito mais pronunciado na redução das contagens celulares, aproximando-se dos níveis observados com DAPT.

5 **C.NOTCH3 É ATIVADO EM CÉLULAS SENSÍVEIS A ANTI-NRR3**

Para investigar a situação de ativação de Notch3 nas três classes de T-ALL, foi desenvolvido um novo anticorpo anti-ICD Notch3 que reconhece ICD Notch3 dividido (ou seja, ativado). Utilizando procedimentos padrão, anticorpos policlonais de coelhos foram levantados contra um peptídeo correspondente ao terminal N do ICD Notch3 que se espera resultar da divisão de gamassecretase no local S3. A sequência de peptídeos utilizada foi: VMVARRKREHSTLW (SEQ ID N° 4). O peptídeo foi conjugado a BSA para as imunizações. Anticorpos policlonais foram purificados sobre uma coluna de proteína A e utilizados em seguida para imunomanchas, conforme exibido na Figura 12. Para testar se o anticorpo reconheceu ICD Notch3 nuclear dividido, foi utilizada a linhagem de células de câncer de mama basal MDA-MB-468. Esta linha expressa altos níveis de Notch3. As células foram tratadas com Jag1 imobilizado (R&D Systems) (ou Fc como controle) para induzir a sinalização de Notch e foram isoladas frações citoplasmática (C) e nuclear (N) nos tempos indicados após a indução. Como controle para examinar o nível de ICD Notch3 presente sem indução de Jag1, as células que não foram induzidas foram tratadas com DAPT (5 µM), DMSO (veículo para DAPT) ou o inibidor de proteassomos MG132 para estabilizar o ICD Notch3, conforme indicado. CREB e tubulina serviram de marcadores para proteínas nucleares e citoplasmáticas, respectivamente. Os resultados da Figura 12 demonstram que o anticorpo anti-ICD Notch3 reconhece uma faixa com o tamanho esperado que está localizada junto ao núcleo e é induzida por Jag1.

Este novo anticorpo anti-ICD Notch3 foi utilizado em seguida

para investigar a situação de ativação de Notch3 nas três classes de T-ALL. Conforme exibido na Figura 13, frações nucleares de células P12 Ichikawa, HPB-ALL e TALL-1 sofreram imunomanchas com Val1744 anti-Notch1, um anticorpo policlonal disponível comercialmente que reconhece ICD Notch1 ativado dividido (Cell Signaling Technologies) (quadro superior) ou com o anticorpo anti-ICD Notch3 (α -N3 ICD Y935, quadro inferior). Foram utilizadas células 3T3 que expressam Notch1 (3T3-N1) e MDA-MB-468 (MB468) como controles. De forma consistente com os estudos de inibição do crescimento descritos nas figuras anteriores, TALL-1 expressa altos níveis de Notch3 ativado mas não Notch1 ativado (compare as linhas TALL-1 nos quadros inferior e superior, respectivamente). Além disso, a produção de Notch3 ativado em TALL-1 pode ser bloqueada por DAPT, mas não anti-NRR1 (quadro inferior). Adicionalmente, conforme esperado, as células HPB-ALL expressam altos níveis de Notch1 ativado, que pode ser bloqueado por DAPT ou anticorpo anti-NRR1 (vide as linhas HPB-ALL no quadro superior). Com relação aos controles, Notch1 ativado é observado como uma faixa mais clara voltada para cima nas células 3T3-N1 tratadas com Jagged (+jag) (quadro superior). Além disso, observa-se Notch3 ativado como faixa fraca mas detectável nas células MDA-MB-468 tratadas com um anticorpo agonista anti-Notch3 (A13, descrito no Pedido de Patente Publicado Norte-Americano nº US 2008/0118520 A1 como 256A-13) na ausência de DAPT (quadro inferior).

Embora a presente invenção tenha sido descrita em alguns detalhes como forma de ilustração e exemplo para fins de clareza de compreensão, as descrições e os exemplos não deverão ser interpretados como limitadores do escopo da presente invenção. As descrições de todas as literaturas científicas e patentes mencionadas no presente são expressamente incorporadas integralmente como referência.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE NOTCH3, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para tratar leucemia de células T sensível a GSI que não reage a um antagonista 5 específico de Notch1.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a leucemia de células T é uma leucemia linfoblástica.

3. USO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a leucemia de células T é T-ALL.

10 4. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o antagonista específico de Notch3 é um anticorpo antagonista anti-Notch3.

5. USO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-Notch3 é anticorpo NRR anti-Notch3.

15 6. USO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o anticorpo NRR anti-Notch3 liga-se aos domínios LNR-A e HD-C de NRR Notch3.

7. USO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o anticorpo NRR anti-Notch3 é uma forma humanizada do 20 anticorpo 256A-4 ou 256A-8.

8. USO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o anticorpo NRR anti-Notch3 comprehende as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo 256A-4 ou 256A-8.

25 9. USO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-Notch3 é um anticorpo anti-Notch3 que liga-se a uma ou mais repetições do tipo EGF de Notch3.

10. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que o medicamento compreende adicionalmente uma quantidade eficaz de um antagonista específico de Notch1.

11. USO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o antagonista específico de Notch1 é um anticorpo 5 antagonista anti-Notch1.

12. USO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo NRR anti-Notch1.

13. USO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado 10 pelo fato de que o anticorpo NRR anti-Notch1 liga-se aos domínios LNR-A, LNR-B e HD-C de NRR Notch1.

14. USO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo NRR anti-Notch1 é selecionado a partir do anticorpo A, A-1, A-2 e A-3.

15. USO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo NRR anti-Notch1 compreende as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de CDRs de um anticorpo selecionado a partir do anticorpo A, A-1, A-2 e A-3.

16. USO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado 20 pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-Notch1 é um anticorpo anti-Notch1 que liga-se a uma ou mais repetições do tipo EGF de Notch1.

17. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que liga-se a ICD Notch3 ativado.

18. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 17, 25 caracterizado pelo fato de que o anticorpo liga-se ao peptídeo de SEQ ID N° 4.

19. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é policlonal.

20. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 17,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo é monoclonal.

21. MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM CÂNCER, que é apropriado para tratamento com um antagonista de Notch3, caracterizado pelo fato de que o método compreende contatar uma amostra do câncer 5 com o anticorpo, conforme definido na reivindicação 17, e determinar se níveis significativamente altos de Notch3 ativado estão presentes na amostra, em que a presença de níveis significativamente altos de Notch3 ativado indica que o câncer é apropriado para tratamento com um antagonista de Notch3.

10 22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o câncer é sensível a GSI.

90,7% DE IDENTIDADE EM 2556 SOBREPOSIÇÕES DE RESÍDUOS; AVALIAÇÃO: 13215,0;
GAP FREQUENCY: 1,0%

SER HUMANO CAMUNDONGO	1	MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPRCQDP 1 MPRLTPLLCLTLLPALAARGLRCSQPSGTCLNGGRCEVASGTEACVCSGAFVGQRCQDS ***** Signal Peptide	EGF1
SER HUMANO CAMUNDONGO	61	NPCLSTPCKNAGTCHVVDRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCRNGGTC DLL 61 NPCLSTPCKNAGTCHVVDRGVADYACSCPLGFSGPLCLTPLDNACLANPCRNGGTC DLL ***** EGF2	EGF3
SER HUMANO CAMUNDONGO	121	TLTEYKRCPPGWSGKSCQOADCASNPCANGGQCLPFEASYIICHCPPSFHGPTCRQDVN 121 TLTEYKRCPPGWSGKSCQOADCASNPCANGGQCLPFESSYICRCPGFHGPTCRQDVN ***** EGF4	
SER HUMANO CAMUNDONGO	181	ECGQKPGLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRAHTGPNCERPVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVT 181 ECSQNPGLCRHGGTCHNEIGSYRCACRATHGPHELPYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDTT ***** EGF5	EGF6
SER HUMANO CAMUNDONGO	241	HECACLPGFTQNCCEENIDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPEWTGQYCTEDVDECQ 241 HECACLPGFAGQNCCEENVDDCPGNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPEWTGQYCTEDVDECQ ***** EGF7	EGF8
SER HUMANO CAMUNDONGO	301	LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVNGWTGEDCSENIDDCASAACFHGATCHDRVASFYCE 301 LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVNGWTGEDCSENIDDCASAACFQGATCHDRVASFYCE ***** EGF9	
SER HUMANO CAMUNDONGO	361	CPHGRRTGLLCHLNDAISNPCNEGSNCDTNPVNKAICTCPSEGYTGPAQSQDVDECSLGA 361 CPHGRRTGLLCHLNDAISNPCNEGSNCDTNPVNKAICTCPSEGYTGPAQSQDVDECALGA ***** EGF10	EGF11
SER HUMANO CAMUNDONGO	421	NPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPCEIDVNECVSNPCONDATCLDQIGEFQICICMP 421 NPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPCEIDVNECISNPCCONDATCLDQIGEFQICICMP ***** EGF12	
SER HUMANO CAMUNDONGO	481	GYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLCQYDVDECSTPCKNG 481 GYEGVYCEINTDECASSPCLHNGHCMDKINEFQCCPKGFNGHLCQYDVDECSTPCKNG ***** EGF13	EGF14
SER HUMANO CAMUNDONGO	541	AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTCHCEVDIDECDPDPCHYGSKDGVATFTCLCRPGYTGHHC 541 AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTCHCEVDIDECDPDPCHYGSKDGVATFTCLCQPGYTGHHC ***** EGF15	
SER HUMANO CAMUNDONGO	601	ETNINECSSQPCRHHGTCQDRDNAYLCFCLKTTGPNEINLDDCASSPCDSGTCLDKID 601 ETNINECHSQPCRHHGTCQDRDNSYLCCLCLKTTGPNEINLDDCASNPCDSGTCLDKID ***** EGF16	EGF17

Fig. 1A

SER HUMANO 661 GYECACEPGYTGSMCNINIDEAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPEGYHDPTCLSEVNEC
 CAMUNDONGO 661 GYECACEPGYTGSMCNVNIDEAGSPCHNGGTCEDGIAGFTCRCPEGYHDPTCLSEVNEC

 EGF18 *****
 EGF19

SER HUMANO 721 NSNPCVHGACRDSLNGYKCDCDPGWSGTNCIDINNNECESNPCVNGGCKDMTSGYVCTCR
 CAMUNDONGO 721 NSNPCIHGACRDGLNGYKCDCAPGWSGTNCIDINNNECESNPCVNGGCKDMTSGYVCTCR

 EGF20 *****

SER HUMANO 781 EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTCIDDVAGYKCNCCLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRN
 CAMUNDONGO 781 EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTCIDDVAGYKCNCCLPYTGATCEVVLAPCATSPCKN

 EGF21 *****
 EGF22

SER HUMANO 841 GGECRQSEDYESFSCVCPGWQGQTCEVDINECVLSPCRHGAQNTHGGYRHCQAGYS
 CAMUNDONGO 841 SGVCKESEDYESFSCVCPGWQGQTCEVDINECVKSPCRHGAQNTNSYRCLCQAGYT
 * * *****
 EGF23 *****

SER HUMANO 901 GRNCETDIDDCRPNPCHNGGCTDGINTAFCDCLPGFRGTFCEEDINECASDPCRNGANC
 CAMUNDONGO 901 GRNCESDIDDCRPNPCHNGGCTDGINTAFCDCLPGFQGAFCEEDINECASNPCQNGANC

 EG24 *****
 EGF25

SER HUMANO 961 TDCVDSYTCTCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQH
 CAMUNDONGO 961 TDCVDSYTCTCPVGFGNIGCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQY

 EGF26 *****

SER HUMANO 1021 DVNECDSQPCLHGGTCQDGCGSYRCTCPQGYTGPNCQNLVHWCDSSPCKNGGKCWQTHQ
 CAMUNDONGO 1021 DVNECDSRPCLHGGTCQDSYGTYKCTCPQGYTGLNCQNLVRWCDSAPCKNGGRCWQTNQ

 EGF27 *****
 EGF28

SER HUMANO 1081 YRCECPGWTGLYCDVPSVSCEVAARQOGVDVARLCQHGGLCVDAGNTHHRCRQAGYTGS
 CAMUNDONGO 1081 YHCECRSGWTGVNCVDSLVSCEVAARQKRGIDVTLLCQHGGLCVDEGDKHYCHCQAGYTGS
 *
 EGF29 *****

SER HUMANO 1141 YCEDLVDECSPSPCQNGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVNCSEEIDECLSHPCQNGGTCLD
 CAMUNDONGO 1141 YCEDEVDECSPNPQCQNGATCTDYLGGFSCKCVAGYHGSNCSEEINECLSQPCQNGGTCID

 EGF30 *****
 EGF31

SER HUMANO 1201 LPNTYKCSCPRTQGVHCEINVDDCNPPVPVSRSRSPKCPNNGTCVDQVGGYSTCOPPGFV
 CAMUNDONGO 1201 LTNSYKCSCPRTQGVHCEINVDDCHPPLDPASRSPKCFNNGTCVDQVGGYTCOPPGFV
 *
 EGF32 *****

SER HUMANO 1261 GERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPCKNGG
 CAMUNDONGO 1261 GERCEGDVNECLSNPCDPRGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCRGKPCKNGG

 EGF33 *****
 EGF34

Fig. 1B

Fig. 1C

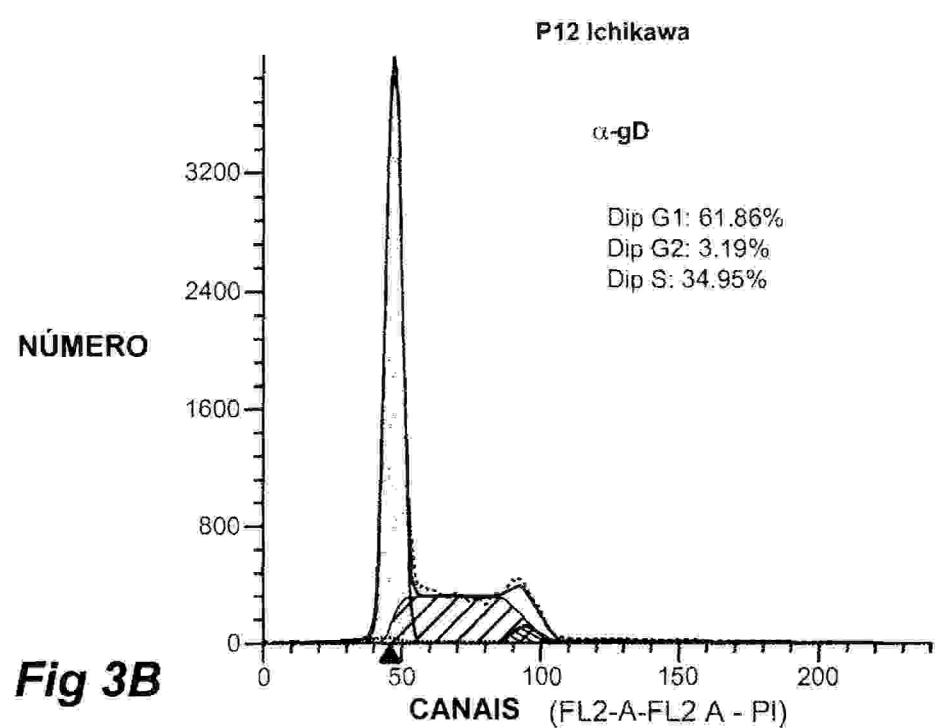
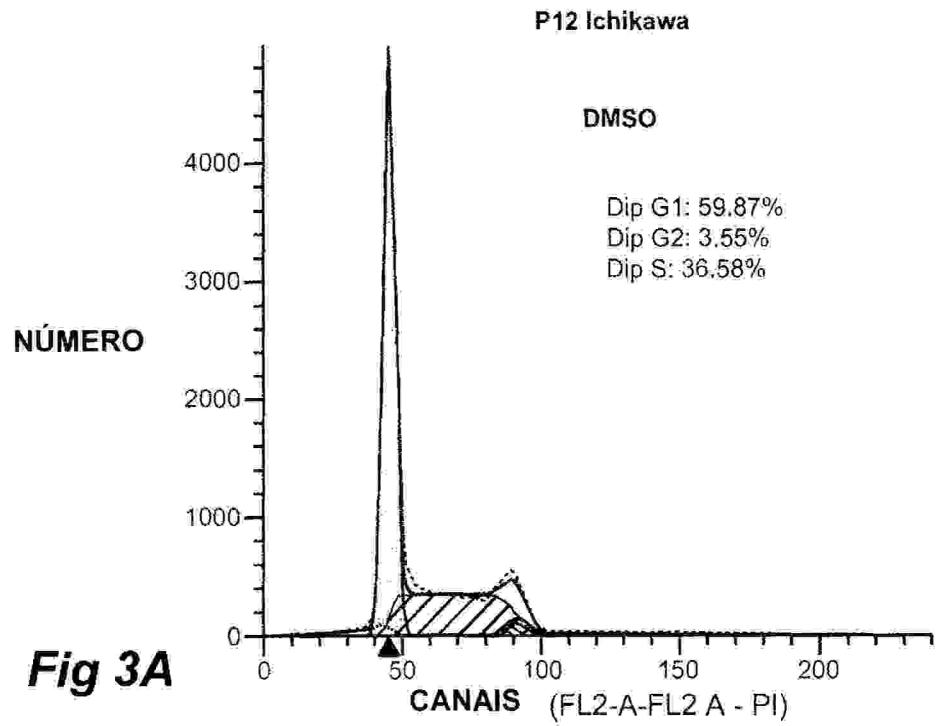
SER HUMANO CAMUNDONGO	1981 1971	IRNRATDLDARMHDGTPPLILAARLAVEGMLEDLINSHADNAVDDILGKSALHWAAAVNN LRNRATDLDARMHDGTPPLILAARLAVEGMLEDLINSHADNAVDDILGKSALHWAAAVNN
SER HUMANO CAMUNDONGO	2041 2031	VDAAVVLLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDI TDHMDRLPRDI VDAAVVLLKNGANKDMQNNKEETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDI TDHMDRLPRDI
SER HUMANO CAMUNDONGO	2101 2091	AQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGKKVRK AQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGTLGGTPTLSPTLCSPNGYLGNLKSATQGKKARK
SER HUMANO CAMUNDONGO	2161 2151	PSSKGLAGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSGMLSPVDSLESPHGYLSDVASPPLL PSTKGLAGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSSMLSPVDSLESPHGYLSDVASPPLL
SER HUMANO CAMUNDONGO	2221 2211	SPFQQSPSPVPLNHLPGMPDTHLGIGHLNVAAKPEMAALGGGRILAFETGPPRLSHLPVAS SPFQQSPSPMPLSHLPGMPDTHLGISHLNVAAKPEMAALAGGSRLAFAEPPPRLSHLPVAS
SER HUMANO CAMUNDONGO	2281 2271	GTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSINGQCEWL SRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAP SASTVLSTNGTGAMNFTVGAPASLINGQCEWL PRLQNGMVPQYNPLRPGVTPTGLSTQAA
SER HUMANO CAMUNDONGO	2341 2331	SLQHGMVGPLHSSLAAASALSQMMSYQLPSTRLATQPHLVQTQQVQPONLQMQQQNLQPA GLQHSMMPGPLHSSLSTNTLSPPII-YQGLPNTRLATQPHLVQTQQVQPONLQLQPONLQP-
SER HUMANO CAMUNDONGO	2401 2389	NIQQQQSLQPPPPPPQPHLGVSSAASGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSLAVHTILPQE -----PSQPHLSVSSAANGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSLVHTILPQE
SER HUMANO CAMUNDONGO	2461 2436	SPALPTSLPSSLVPPVTAQFLTPPSQHSYSS-PVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPQD SQALPTSLPSSMVPPMTTQFLTPPSQHSYSSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPQD
SER HUMANO CAMUNDONGO	2520 2496	WSSSSPHSNVSDWSEGVSPPPTSMQSQIARIPEAFK WSSSSPHSNISDWSEGISSPPTTMAPSQITHIPEAFK

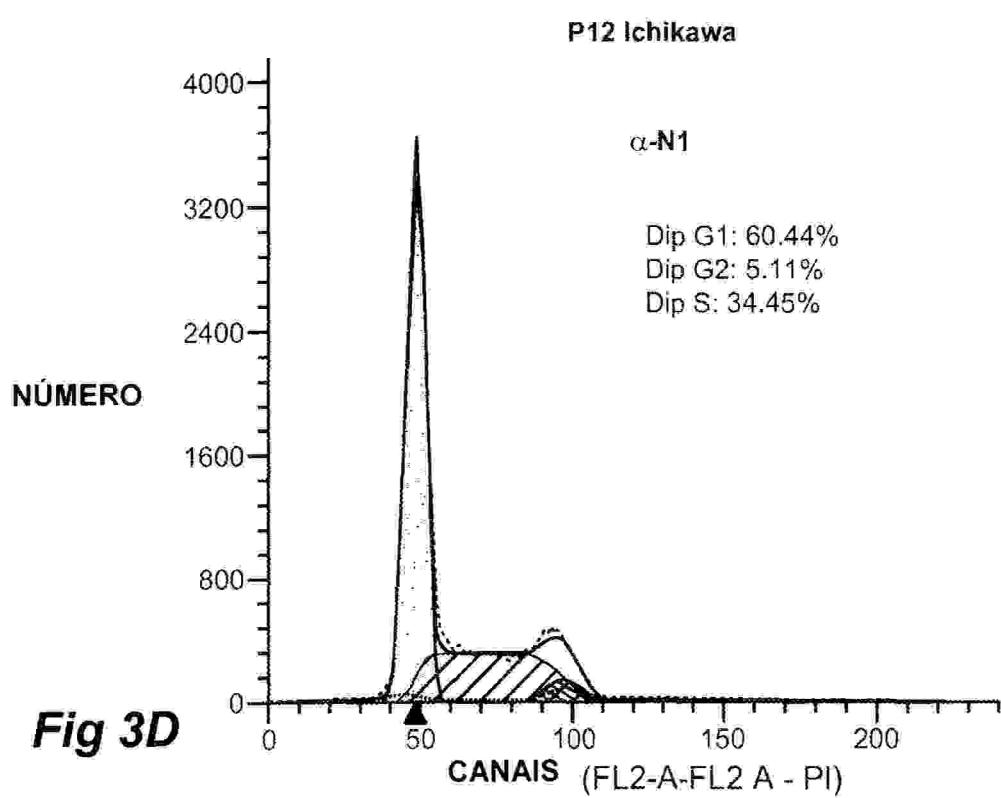
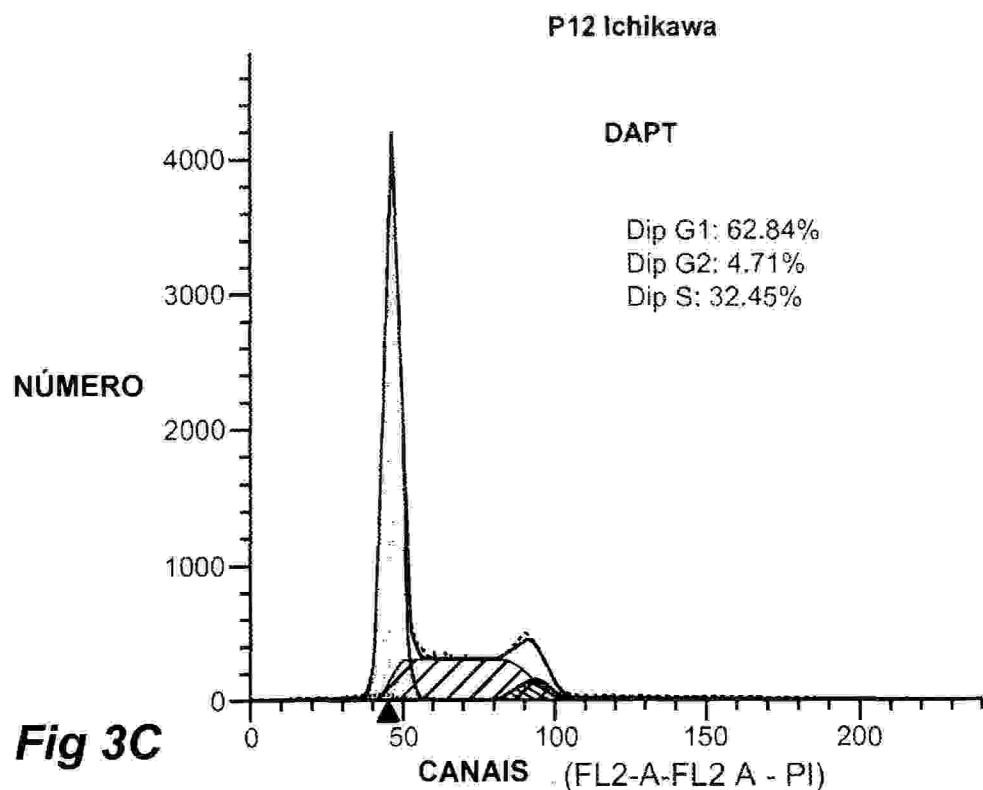
Fig. 1D

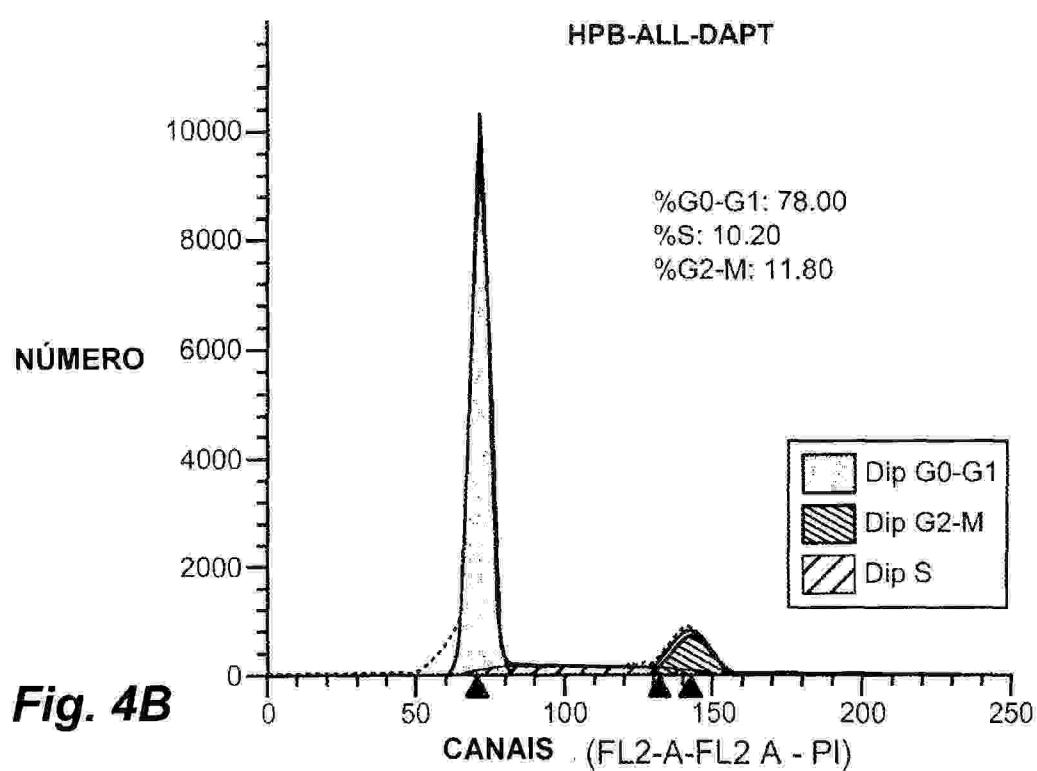
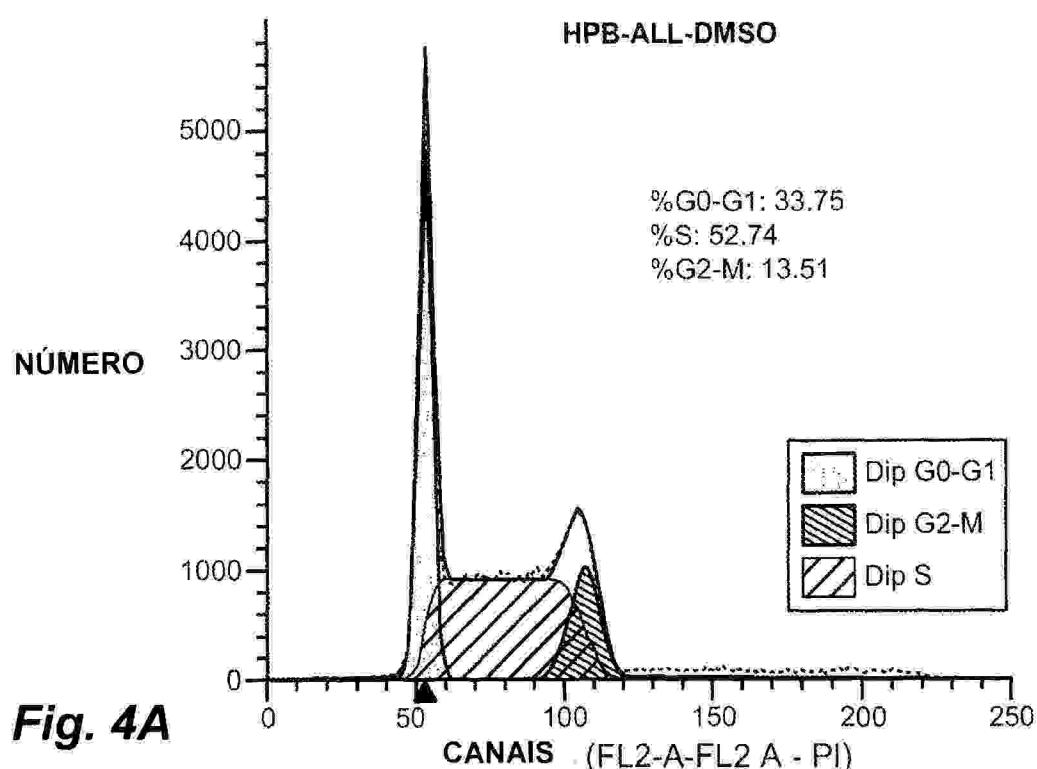
SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE NOTCH 3 HUMANO (NP_000426)

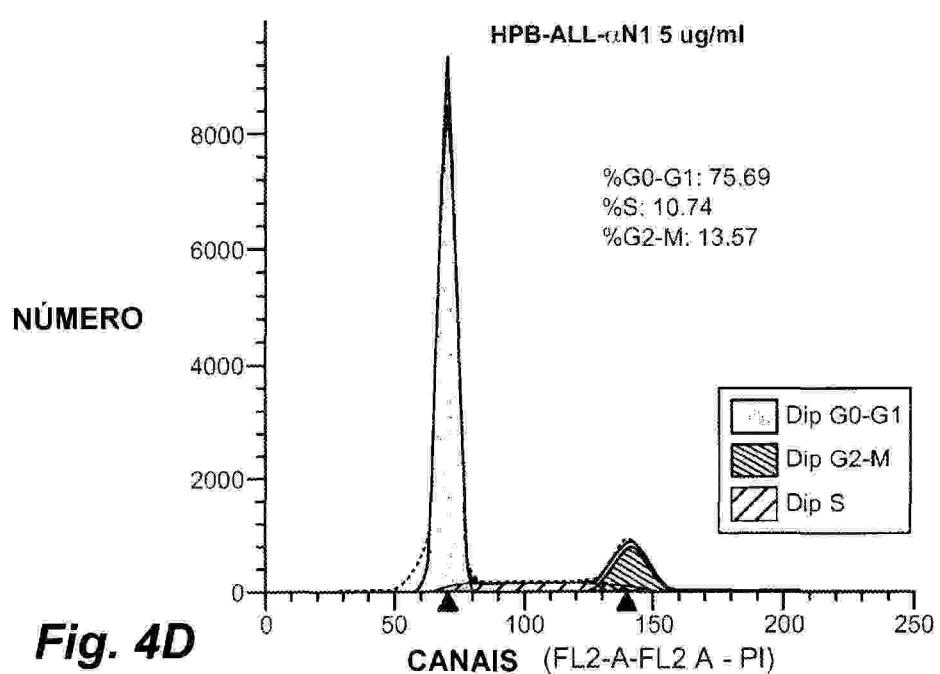
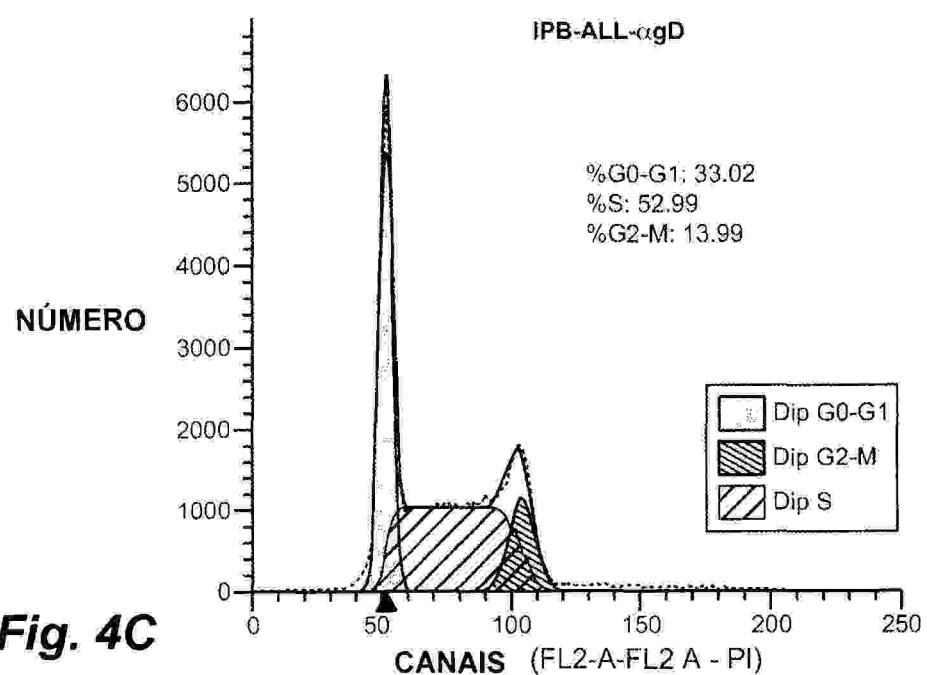
1 MGPAGRGRRR RRRPMSPPPP PPPVRALPLL LILAGPGAAA PPCLDGSPCA NGGRCTOLPS
 61 REAACICPPG WVGERCQLED PCHSGPCAGR GVCQSSVVAG TARFSCRCPR GFRGFDCSLP
 121 DPCLSSPCAII GARCSVGPDG RFLCSCPFGY QGRSCRSDVD ECRVGEPCRH GGTCLNTPGS
 181 FRCQCIPAGYT GPLCENPAVP CAPSPCRNGG TCRQSGDLTY DCACLPGFEG QNCEVNVDCC
 241 PGHRCLNGGT CVDGVNTYNC QCPPEWTGQF CTEDVDECQL QPNACHNGGT CFNTLGGHSC
 301 VCVNGWTGES CSQNIIDCAT AVCFHGATCH DRVASFYCAC PMGKTGLLCH LDACVSNPC
 361 HEDAICDTNP VNGRAICTCP PGFTGGACDQ DVDECSIGAN PCEHLGRCVN TOGSFLCQCG
 421 RGYTGPRCET DVNECLSGPC RNQATCLDRI GQFTCICMAG FTGTYCEVDI DECQSSPCVN
 481 GGVCKDRVNG FSCTCPGFTS GSTCQLDVDE CASTPCRNGA KCVDQPDGYF CRCAEGFEGT
 541 LCDRNVDDCS PDPCHHGRCV DGIASFSCAC AFGYTGTRCF SQVDECRSQP CRHGGKCLDL
 601 VDKYLCCRCPG GTTGVNCEVN IDDCASNFCT FGVCRQGINR YDCVCQPGFT GPLCNVEINE
 661 CASSPCGEGG SCVDGENGFR CLCPPGSLPP LCLPPSHPCA HEPCSHGICM DAPGGFRCVC
 721 EPGWSPRCS QSLARDACE3 QPCRAGGTCS SDGMGFHCTC PPGVQGRQCE LISPCTPNPC
 781 EHCCRICESAP GQLPVCSQPO GWQGPRCQD VDFCAGPAPC GPHGICTNIA GSFSTCHGG
 841 YTGPSCQQDI NDCDPNPCLN GGSCQDGVGFS FSCSCI PGFA GPRCARDVDE CISNPGPGT
 901 CTDHVASFTC TCPPGYGGFH CEQQLPDCSP SSCFNNGTCV DGVNSFSCLC RPGYTGAHQ
 961 HEADPCLSRRP CLHGGVCSAA HEGFRCTCLE SFTGPOCOTL VDWCSRQPCQ NGGRCVOTGA
 1021 YCLCOPGWG RLCDIRSLPC REAAAQIGVR LEQICQAGGO CVDEDSSHYC VCPEGRTGSH
 1081 CECEVDPCLA OFCQHGGTGR GYMGGYMCEC LPGYNGDNCE DQVDECASQP CQHGGSCIDL
 1141 VARYLCSPPP GTLGVLCIN EDDCGPFPPL DSGPRCLING TCVDLVGGFR CTCPPGYTGL
 1201 RCEADINECR SGACHAAUTR DCLQDPGGGF RCLCHAGFSG PRCOTVLSPC ESOPCQHGGQ
 1261 CRPSPPGGG LTFTCHCAQF FWGPRCERVA RSCREIOPV GVPCQQTFRG PRCACPPGLS
 1321 GPSCRSFPGS PPGASNASC AAPPCLHGGSC RPAPlAFFJR CACAQGWTFP RCEAPAAAE
 1381 VSE EPRCPRA ACQAKRGDQR CDRECNSPGC GDGGDCSLS VGDPWRQCEA LQCWLNFNN
 1441 RCDPACSSPA CLYDNFDCHA GGRERTCNPV YEKYCADHFA DGRCDQGCNT EECGDGLDC
 1501 ASEVPALLAR GVLVLTVLLP PEELLFSSAD FIQLSAILR TSIRFRLDAM GQAMVFPYHR
 1561 PSPGSEPRAR RELAPEVIGS VVMLEIDNRL C1QSPENDMC FPDAQSAADY LGALSAVERL
 1621 DPFYPLRDVR GEPLEPPEPS VPLLPLIVAG AVLLVLVIL GVMVARRKRE HSTLWFPEGF
 1681 SLHKDVASHI KGRREPVGQD ALGMKNMAKG ESLMGEVATD WMDTECPEAK RLKVEEPGMG
 1741 AEEAVDCRQW TQHHLVAADI KVAPAMALTP PQGDADADGM DVNVRGPDGF TPLMLASFCG
 1801 GALEPMPTEE DEADDTSASI ISDLICQGAQ LGARTDRTGE TALHLAARYA RADAALKLLD
 1861 AGADTNAQDH SGRTPLHTAV TADAQGVQI LIRNRSTDLD ARMADGSTAL IIAARLAVEG
 1921 MVEELIASHA DVNAVDELGK SALHWAAAQN NVEATLALLK NGANKDMQDS KEETPLFLAA
 1981 REGSYEAAKI LLDHFANREI TDHLDRLPRD VAQERLHQDI VRLLDQPSGP RSPPGPMGLC
 2041 PLLCOPGAEI PGKAAQSGS KKSRPFPGKA GLCPQGPRGR GKKLTLACPG PLADSSVTLS
 2101 PVDSLDSPPR FGGFPASPQG FPLEGPYAAA TATAVSLAQL GGPGRAGLGR QPPGCCVLSL
 2161 GLINPVAVPL DWARLFPAP PGPSFLPLA PGPQLNPCT PVSPQERPPP YLAVPGHGEF
 2221 YPVAGAHSSP PKARFLRVPS EHRYTPSPE SPEIWIWASPSP PSLSDWSEST PSPATATGAM
 2281 ATTTGALPAQ PLPLSVPSL AQAQTLGPO PCVTPKRQVLA (SEQ ID NO: 3)

Fig. 2

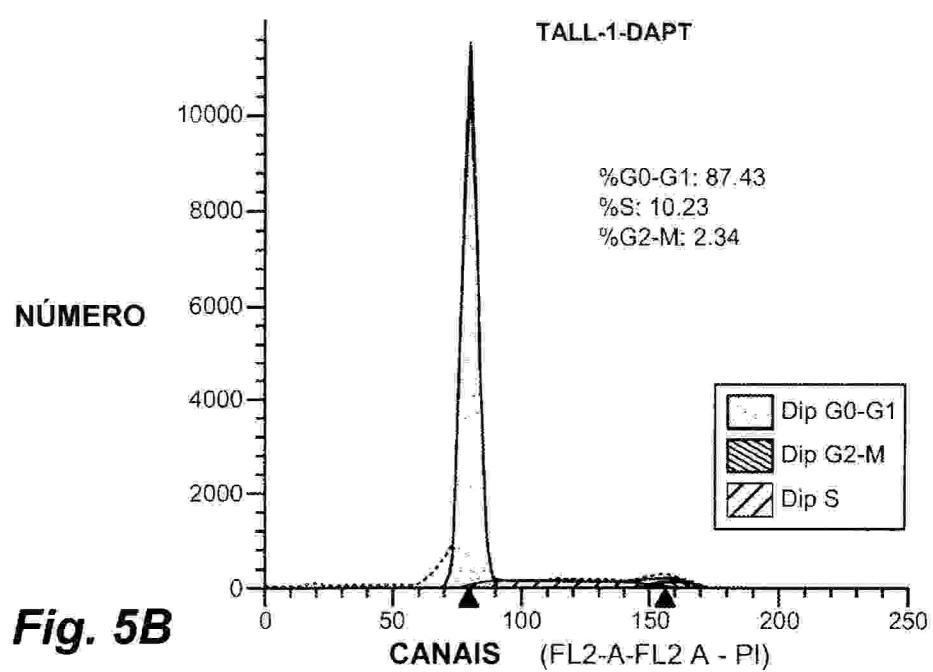
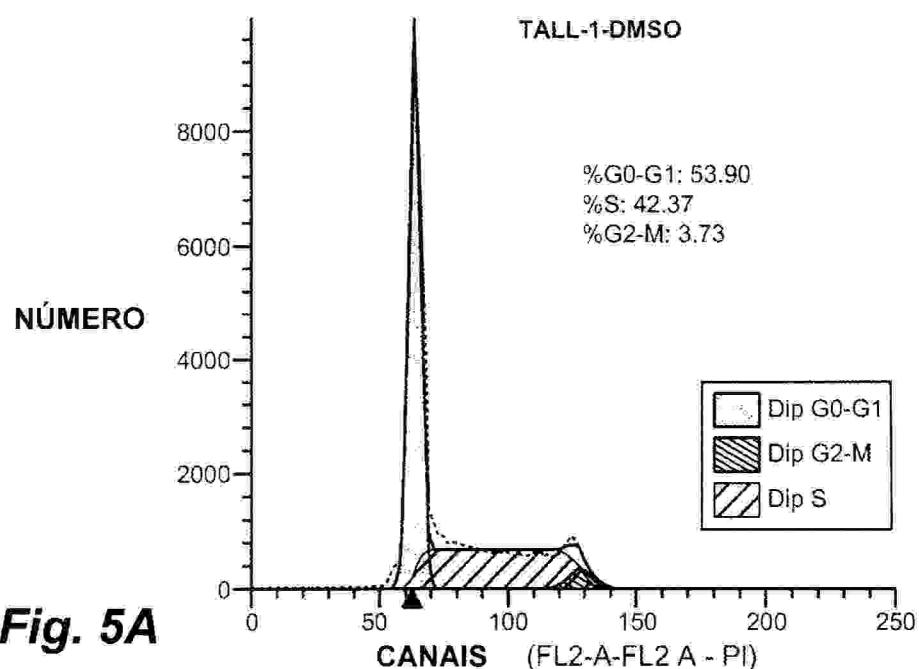


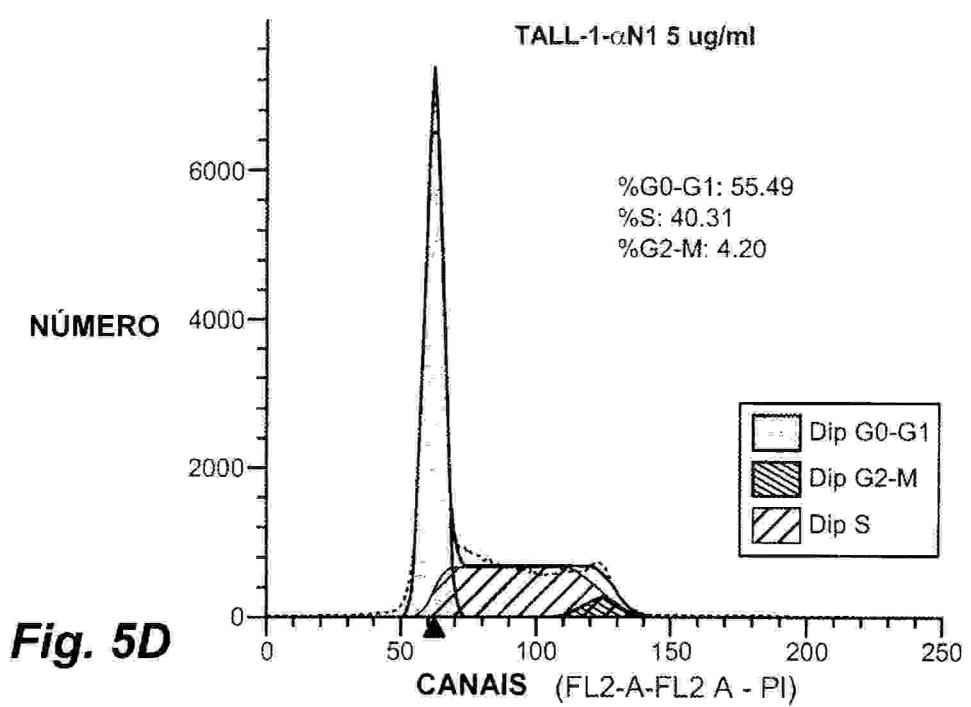
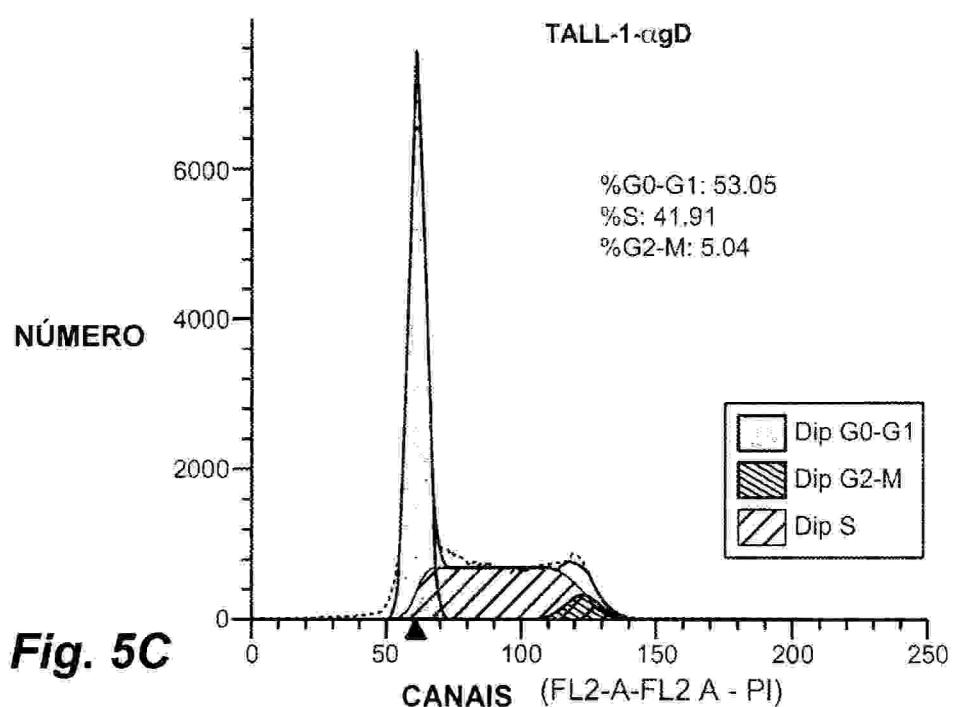






10 / 25





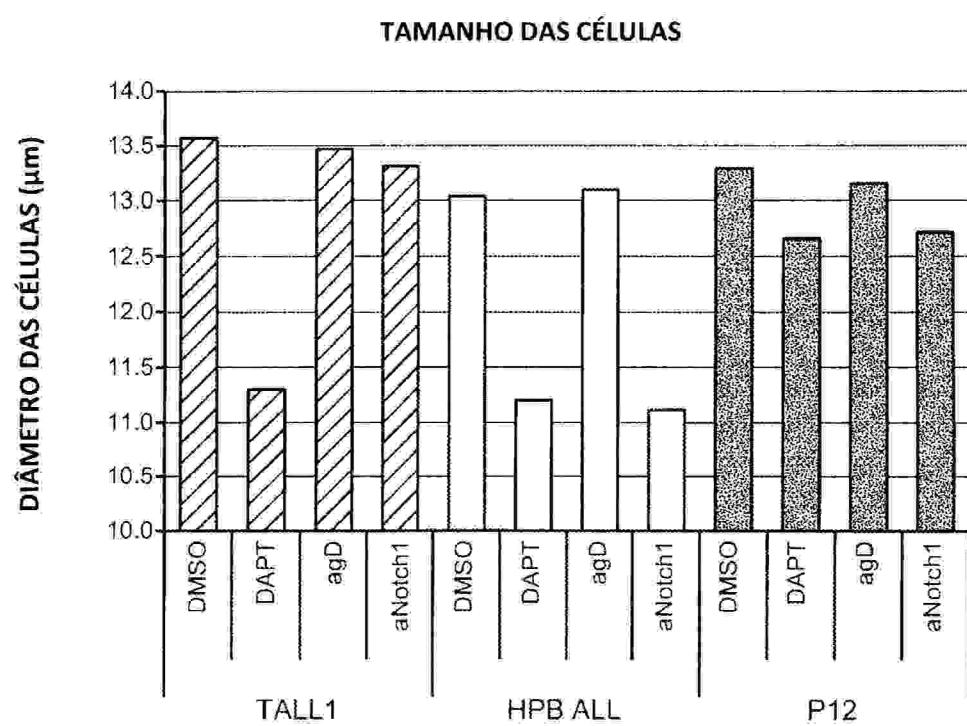
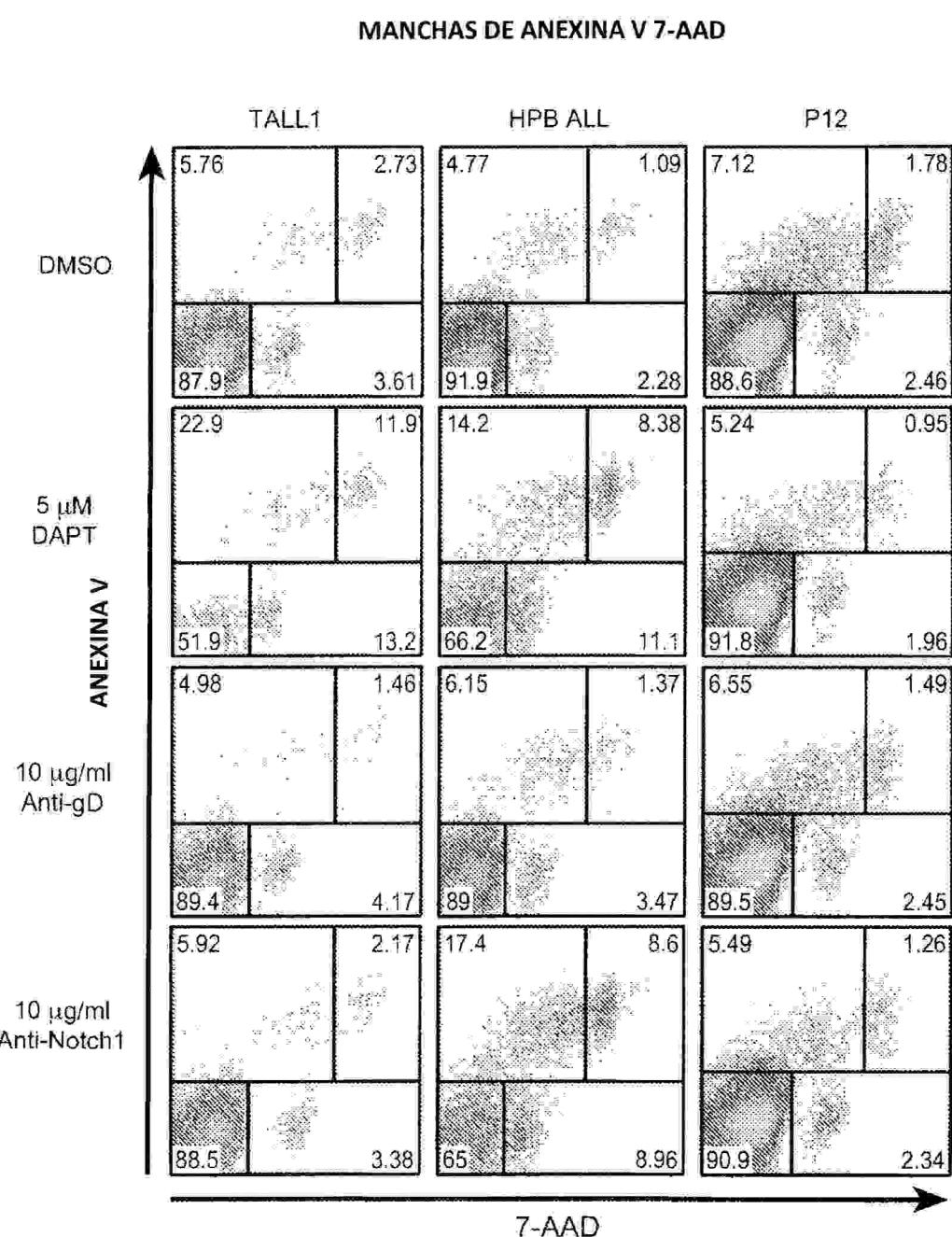


Fig. 6

***Fig. 7***

Anexina V 7-AAD, Contagens de células e manchas
Ki-67

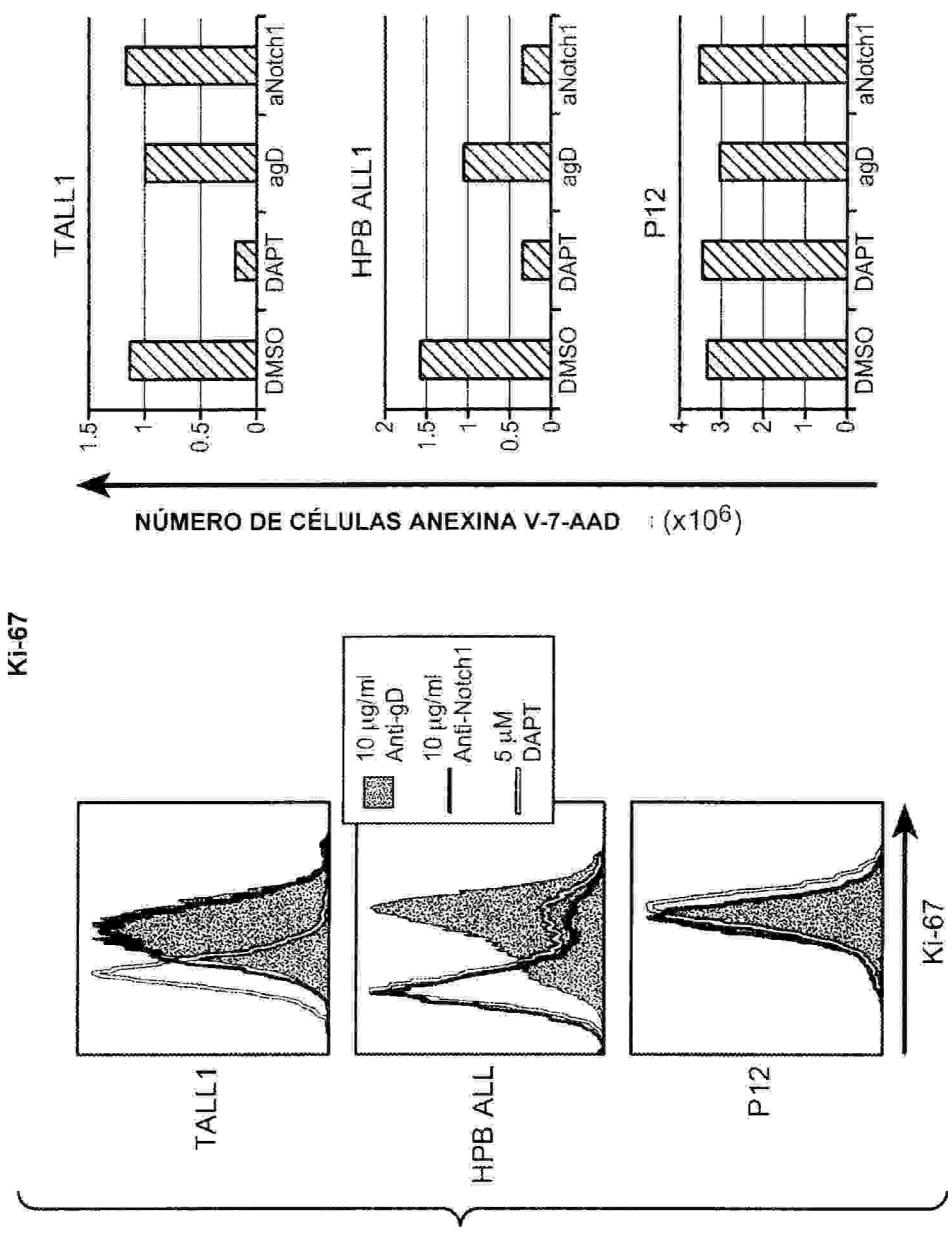
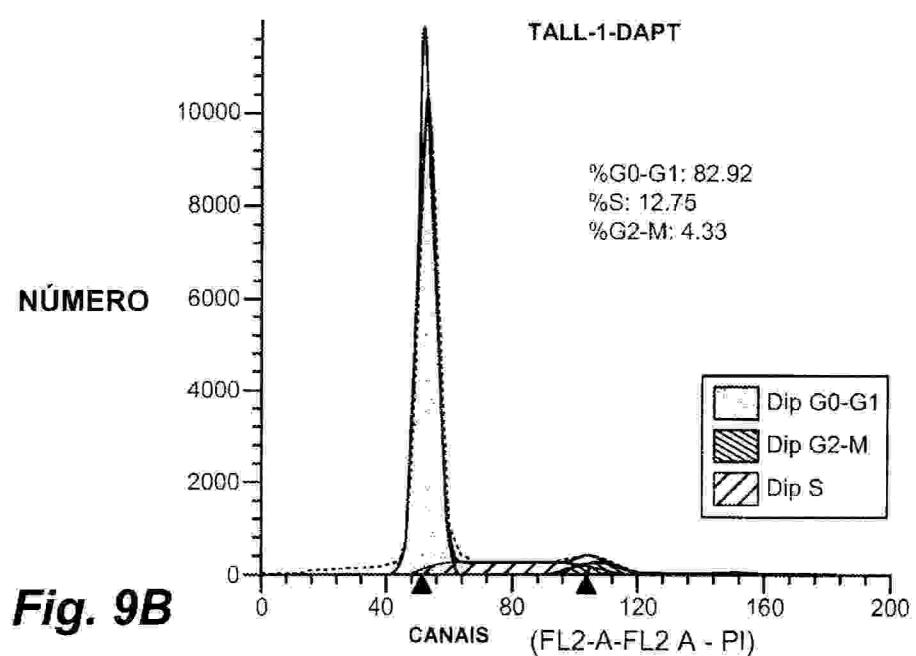
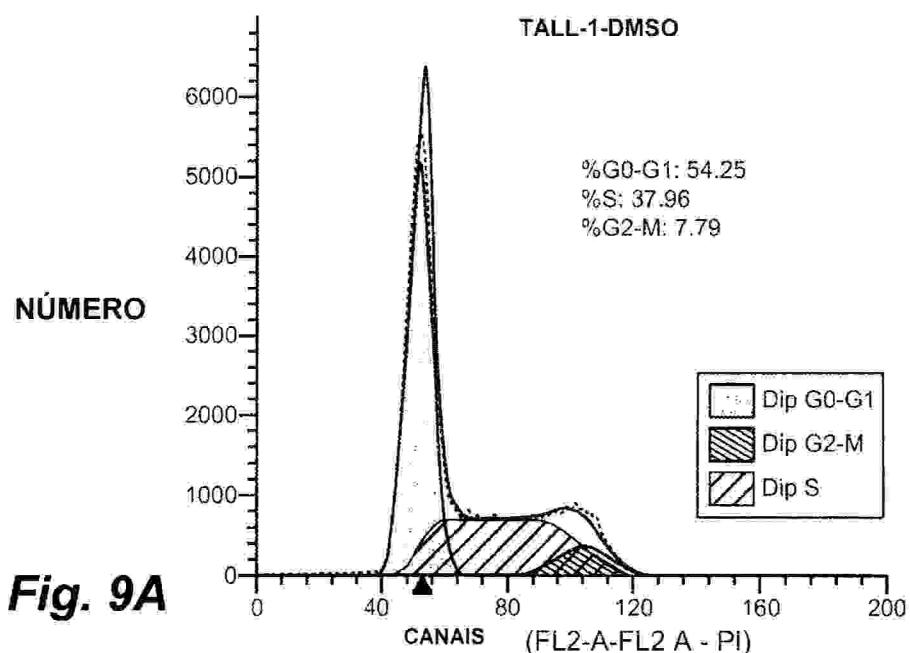


Fig. 8



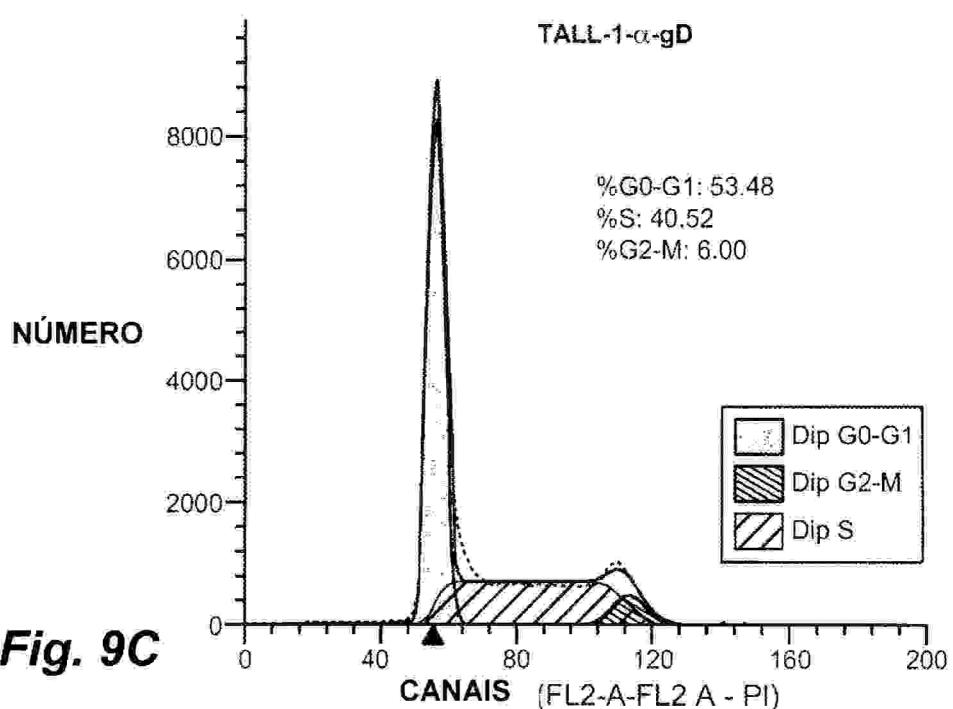


Fig. 9C

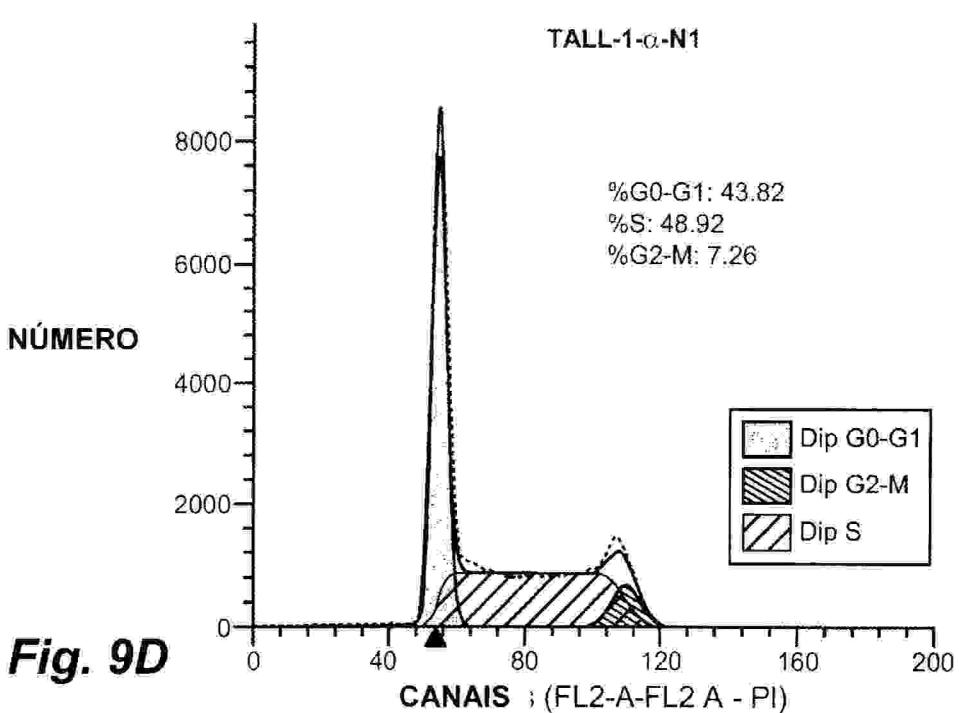
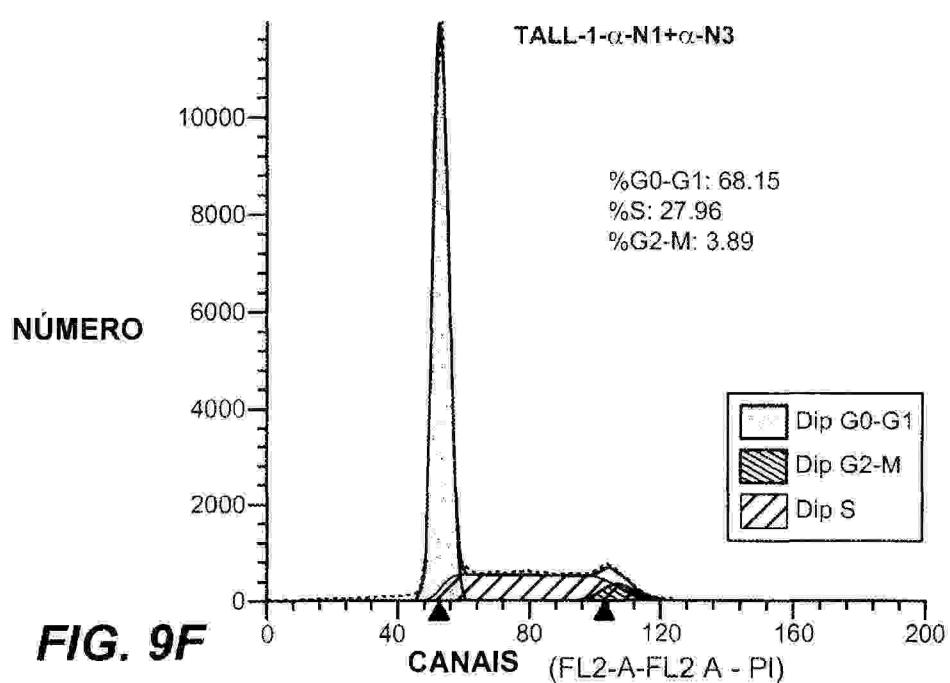
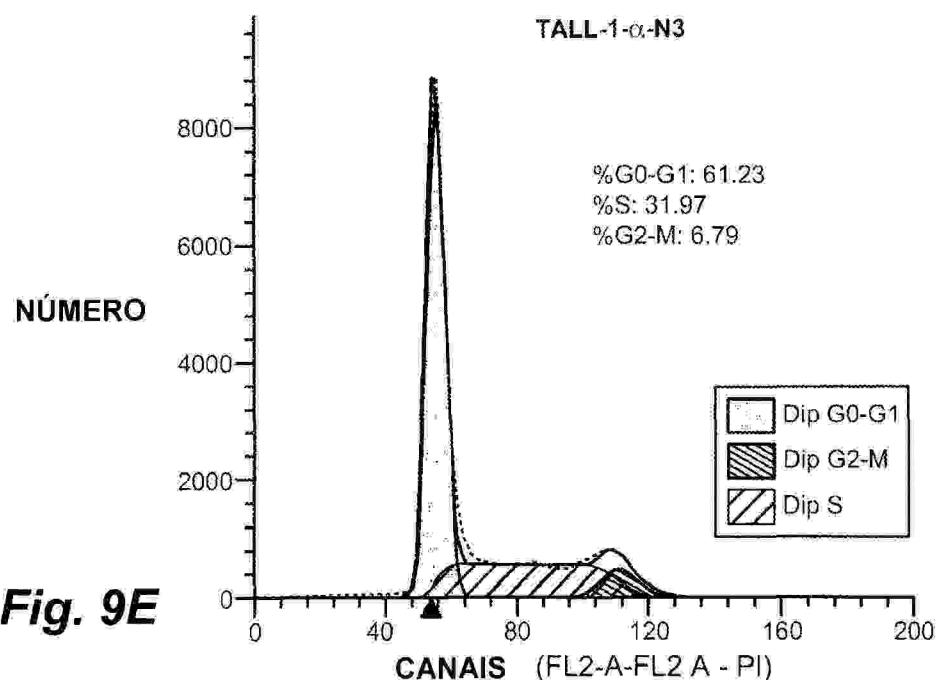


Fig. 9D



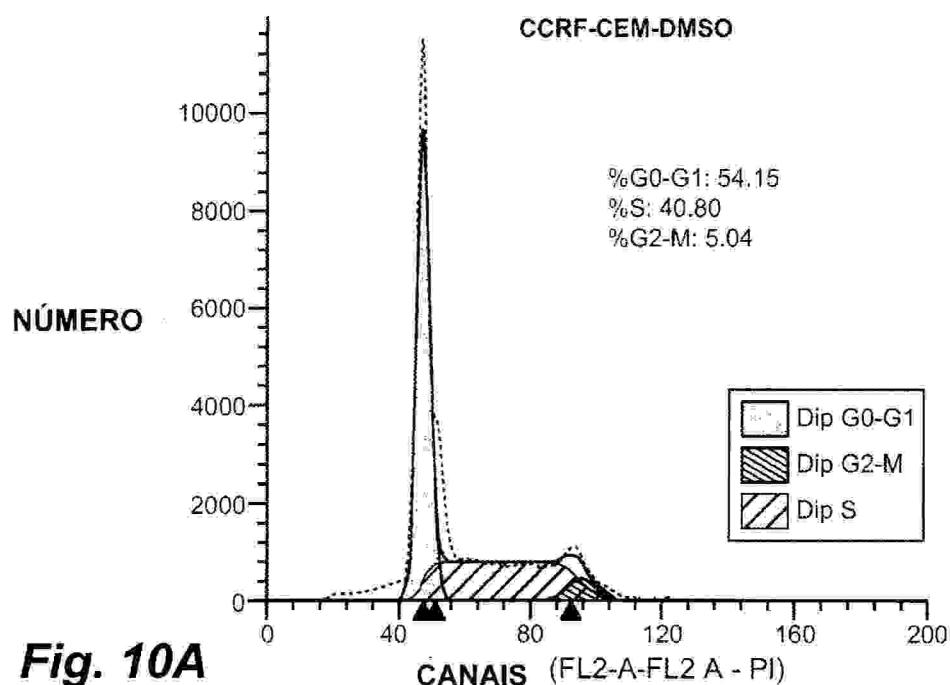


Fig. 10A

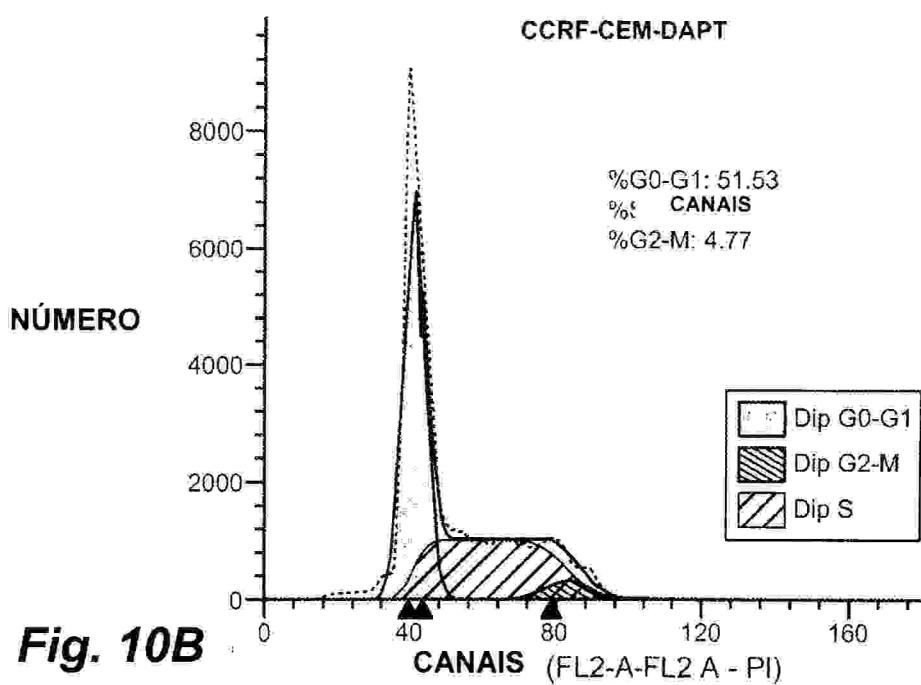


Fig. 10B

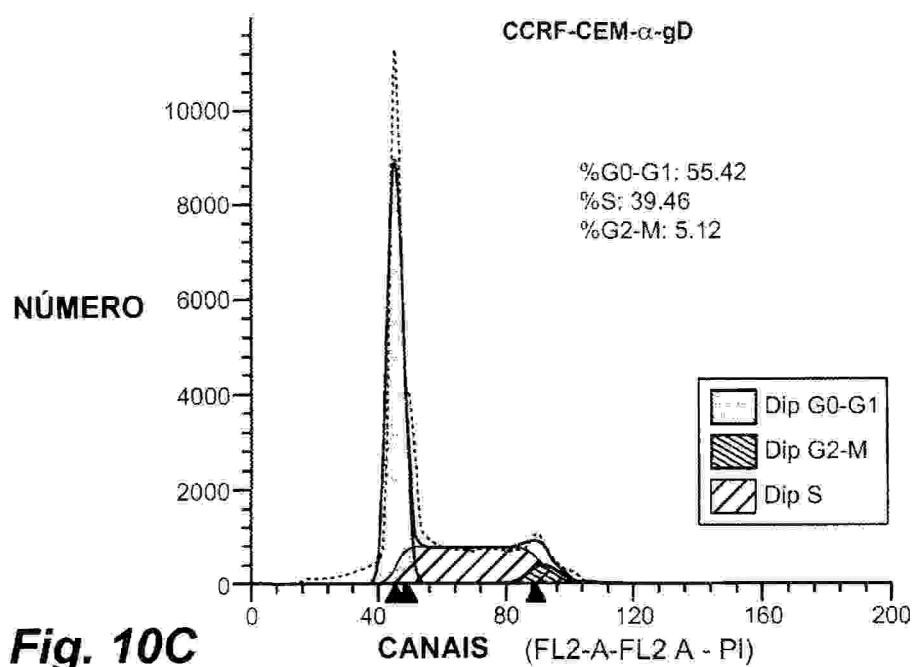


Fig. 10C

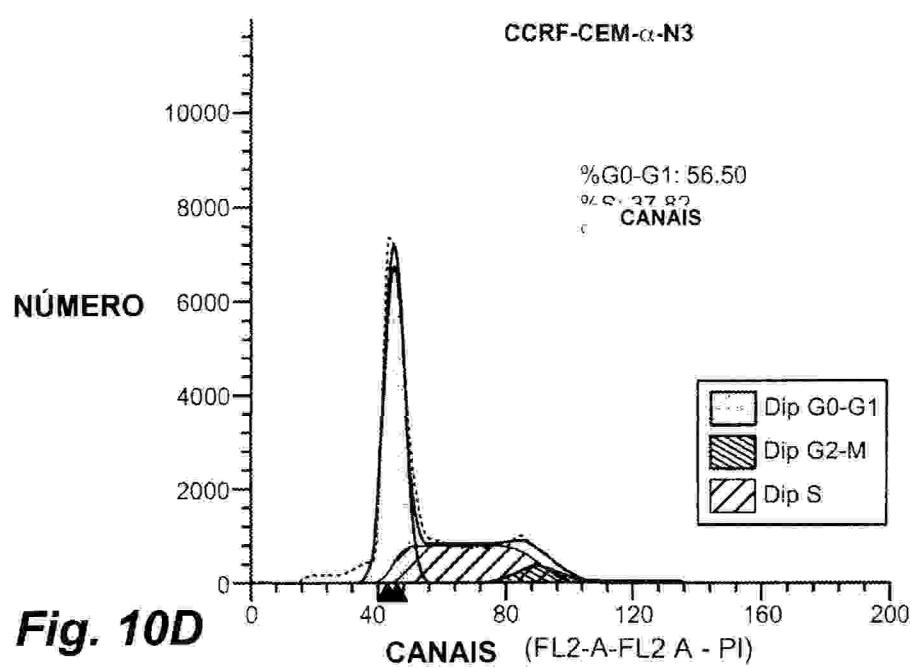


Fig. 10D

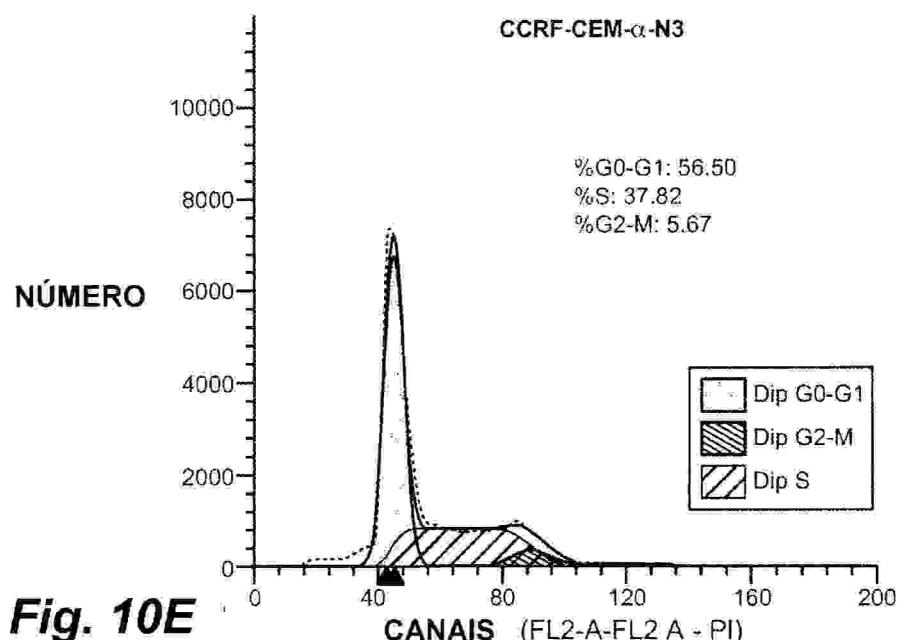


Fig. 10E

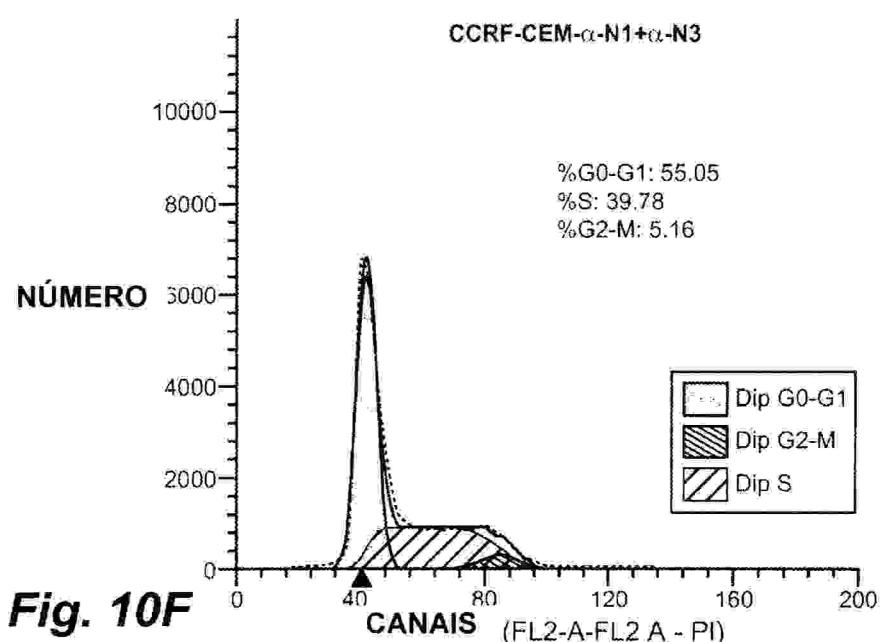
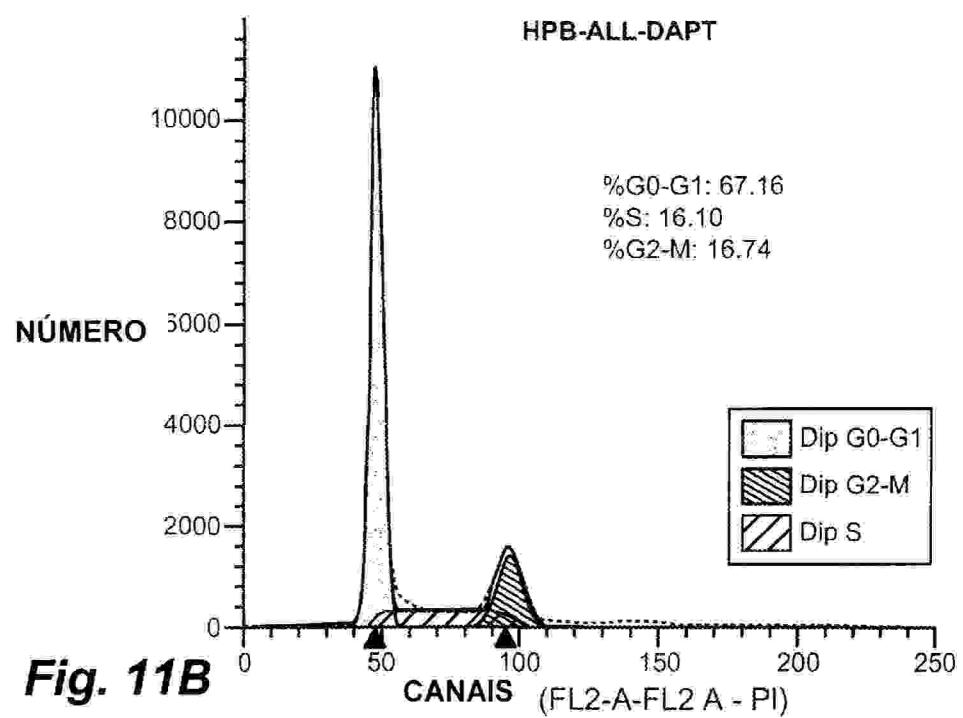
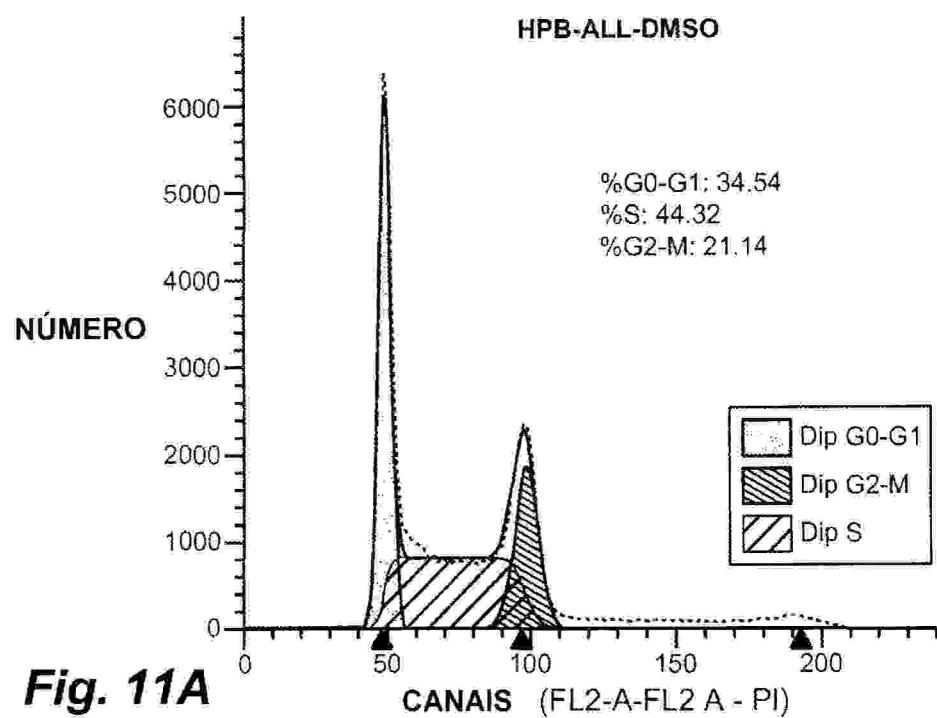


Fig. 10F



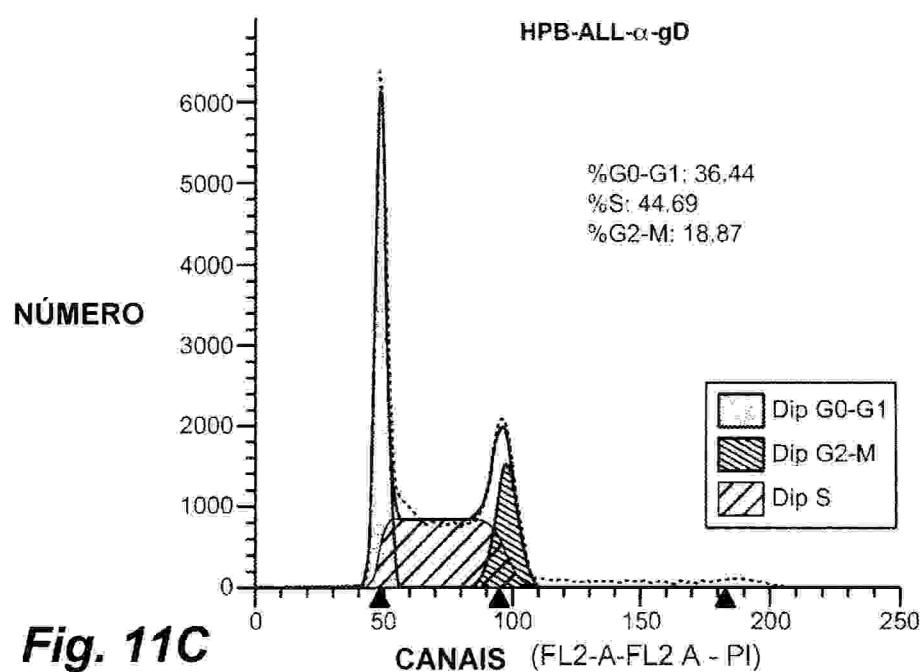


Fig. 11C

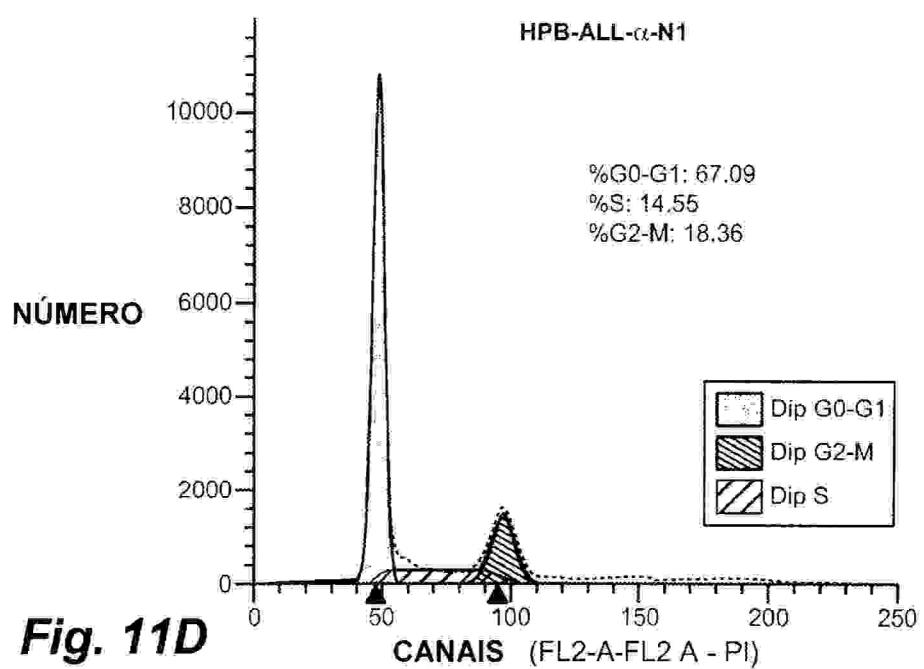


Fig. 11D

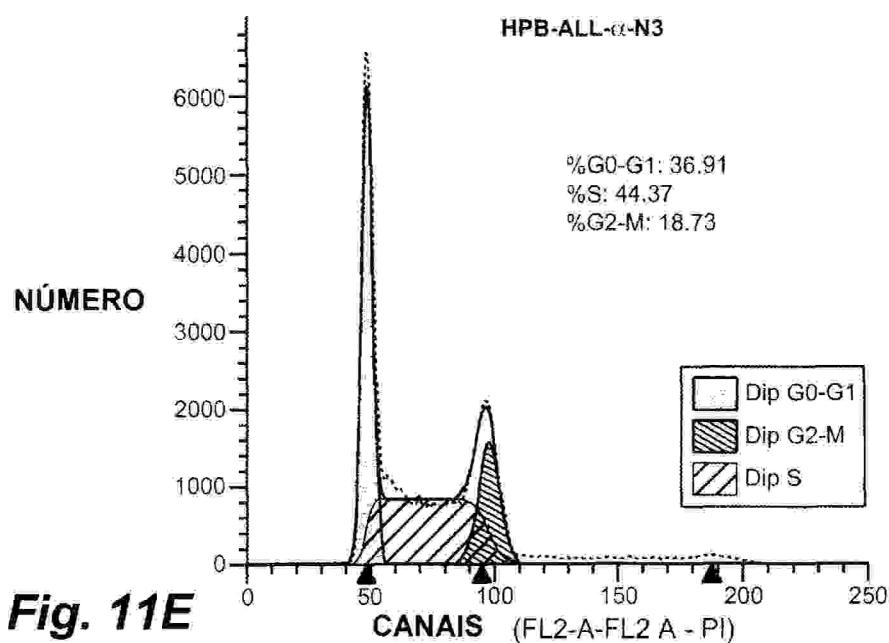


Fig. 11E

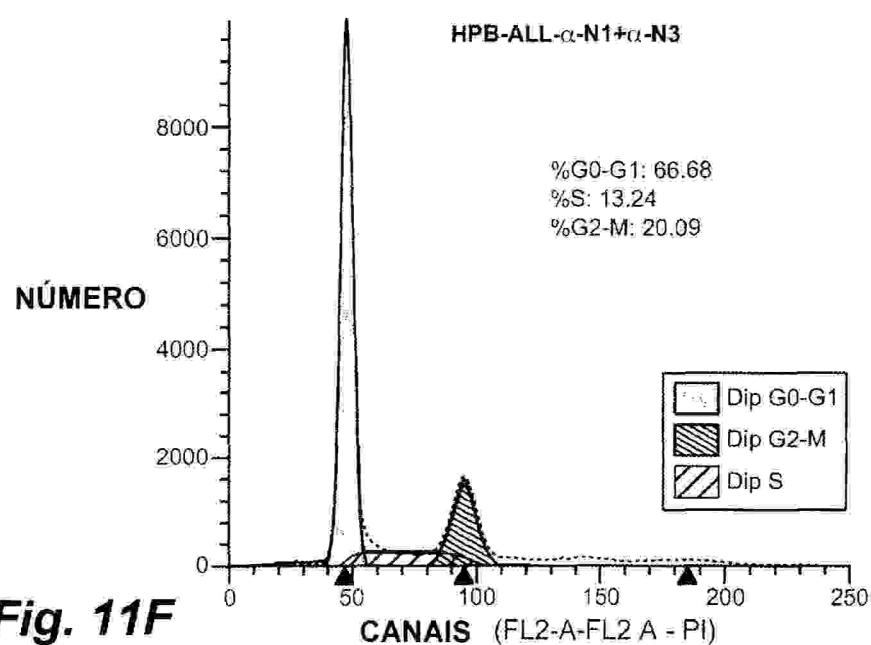


Fig. 11F

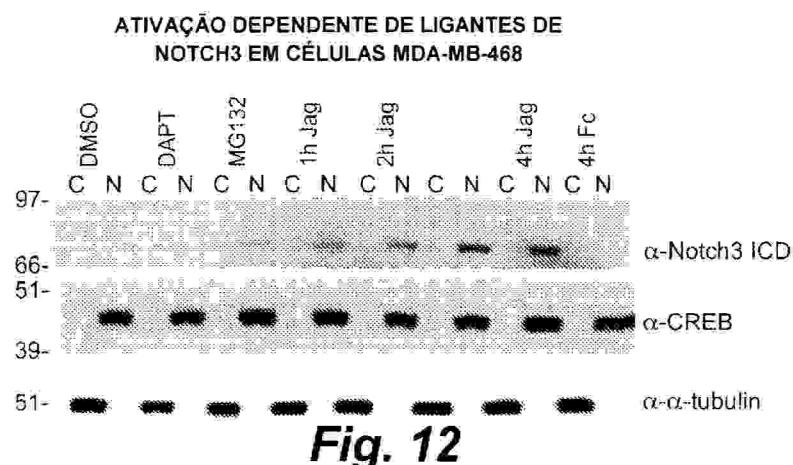


Fig. 12

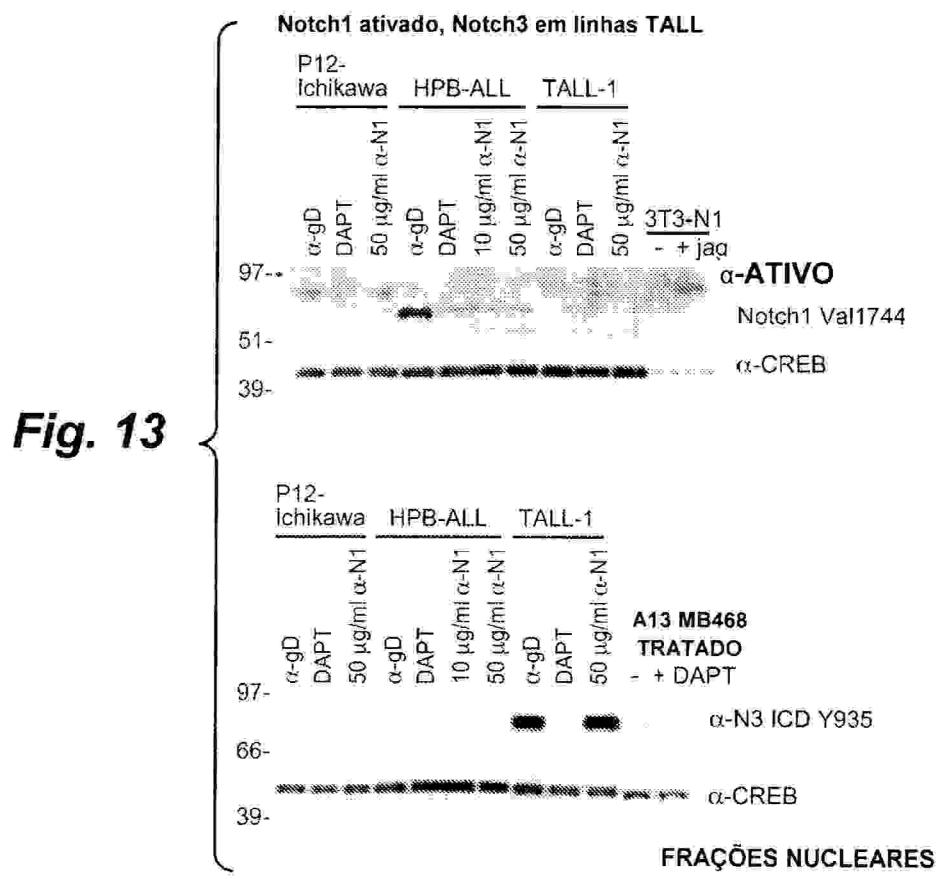


Fig. 13

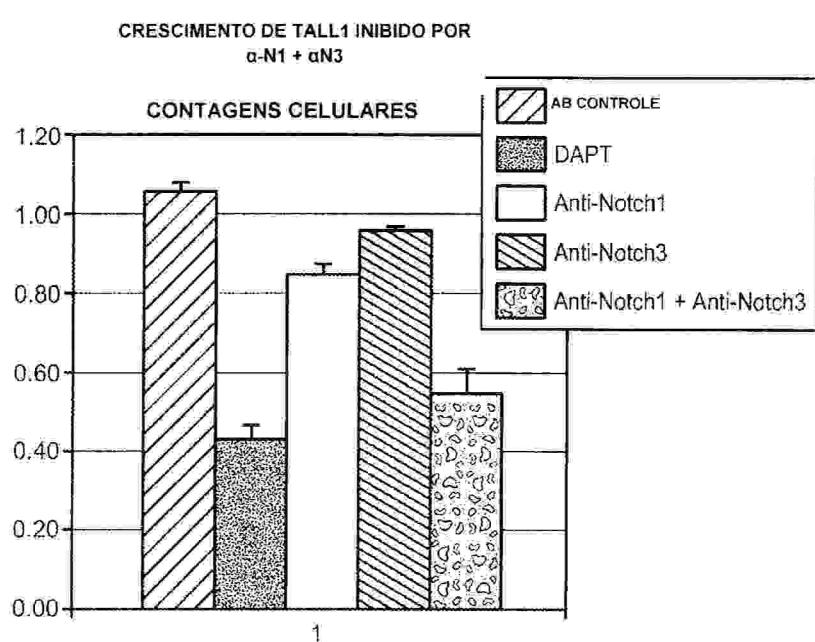


Fig. 14

RESUMO**“USO DE UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE NOTCH3, ANTICORPO E
MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM CÂNCER”**

A presente invenção refere-se a métodos de tratamento de
câncer em geral e de leucemia em particular, utilizando antagonistas Notch1 e
Notch3 isoladamente ou em combinação. São também fornecidos métodos e
composições de tratamento e diagnóstico de cânceres associados a Notch.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



27A57A348A9EA82C

Campo 2



270AF459FCB009A0

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2012 03 28_0041-0248_SEQUENCE_LISTING_JSP.TXT
- Data de Geração do Código: 28-03-2012
- Hora de Geração do Código: 15:28:23
- Código de Controle:
 - Campo 1: 27A57A348A9EA82C
 - Campo 2: 270AF459FCB009A0