PCT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

11-14579

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COM.
INVENTARI

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS C

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-014579- -00000-0000
Fecha: 2011-02-08 16:44:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 219

SOLICITUD DE PATE

INVENCIÓN

TITULO: AGENTES Y ANTAGONISTAS FIJADORES DE NOTCH Y MÉTODOS PARA EL USO DE LOS MISMOS

SOLICITANTE: ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC,

DIRECCIÓN: 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 08 de Febrero de 2011

P2010/000007

Pidió, W
08-02-2011
No Exm

Con 93 folios
11-02-2011

99

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOC

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-014579- -00000-0000
Fecha: 2011-02-08 16:44:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 219

PETITORIO - FORMULARI[illegible] SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2011/000007**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**	**Nombre:** ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. **Dirección:** 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 **Nacionalidad o Domicilio:** Estadounidense **Lugar de Constitución:** Estados Unidos de América. **Teléfono:** _____ **Fax:** _____ **E-mail:** _____	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** [ ] **NIT** [ ] **C.E.** [ ] **Otro** [ ] **Cual** _____ **Número** _____
REPRESENTANTE O APODERADO	**Nombre:** CARLOS R. OLARTE **Dirección:** Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá D.C. , **Teléfono:** 601-7700 **Fax:** 601-7799 **E-mail:** office@olarteraisbeck.com	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** [X] **NIT** [ ] **C.E.** [ ] **Otro** [ ] **Cual** _____ **Número** 79782747Bta **TP** 74.295
INVENTOR (ES) (72)	**Nombre:** VER PAGINA ADJUNTA **Dirección:** VER PAGINA ADJUNTA **Nacionalidad o Domicilio:** VER PAGINA ADJUNTA	

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/003994 Fecha Julio 8, 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/005566 Fecha Enero 14, 2010

(6) **Título (54)** **AGENTES Y ANTAGONISTAS FIJADORES DE NOTCH Y MÉTODOS PARA EL USO DE LOS MISMOS**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

Prioridad **SI** [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Julio 8, 2008	61/079,095
US	Noviembre 7, 2008	61/112,701
US	Noviembre 7, 2008	61/112,699

(9) **Comprobante de pago No.** 11- **Fecha** Febrero de 2010

(10) **ANEXOS**

2

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver Exp. Nº
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2009/993994

Austin, L. GURNEY,
946 Diamond Street,
San Francisco, CA 94114
Estados Unidos
Nacionalida: Estadounidense

Timothy Charles HOEY,
200 Darrel Road,
Hillsborough, CA 94010
Estados Unidos
Nacionalida: Estadounidense

Edward Thein HTUN VAN DER HORST,
1788 Oak Creek Drive #314,
Palo Alto, CA 94304
Estados Unidos
Nacionalida: Alemana

Aaron Ken SATO,
1636 Albemarle Way,
Burlingame, CA 94010
Estados Unidos
Nacionalida: Estadounidense

Yuan Ching LIU,
1108 Sunrise Drive,
Fremont, CA 94539
Estados Unidos
Nacionalida: Estadounidense

Maureen Fitch BRUHNS,
632 42nd Avenue,
San Mateo, CA 94403
Estados Unidos
Nacionalida: Estadounidense

John A. LEWICKI,
308 Escobar Avenue, Los Gatos,
CA 95032
Estados Unidos
Nacionalida: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0011656

Bogotá D.C., Febrero 08 de 2011 - 16:18:51

RECIBIDO DE : OLARTERAISBECK NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	419424530	08/02/2011	2.284.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00	571.000.00
				$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-014579- -00000-0000
Fecha: 2011-02-08 16:44:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 219

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
14 January 2010 (14.01.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/005566 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/003994

(22) International Filing Date:
8 July 2009 (08.07.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/079,095	8 July 2008 (08.07.2008)	US
61/112,701	7 November 2008 (07.11.2008)	US
61/112,699	7 November 2008 (07.11.2008)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GURNEY, Austin, L.** [US/US]; 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114 (US). **HOEY, Timothy, Charles** [US/US]; 200 Darrell Road, Hillsborough, CA 94010 (US). **HTUN VAN DER HORST, Edward, Thein** [DE/US]; 1788 Oak Creek Drive #314, Palo Alto, CA 94304 (US). **SATO, Aaron, Ken** [US/US]; 1636 Albemarle Way, Burlingame, CA 94010 (US). **LIU, Yuan, Ching** [US/US]; 1108 Sunrise Drive, Fremont, CA 94539 (US). **BRUHNS, Maureen, Fitch** [US/US]; 632 42nd Avenue, San Mateo, CA 94403 (US). **LEWICKI, John, A.** [US/US]; 308 Escobar Avenue, Los Gatos, CA 95032 (US).

(74) Agent: **MCCABE, Kevin, W.**; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, N.W., Washington, DC 20005-3934 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

(54) **Title**: NOTCH-BINDING AGENTS AND ANTAGONISTS AND METHODS OF USE THEREOF

(57) **Abstract**: The present invention relates to Notch-binding agents and Notch antagonists and methods of using the agents and/or antagonists for treating diseases such as cancer. The present invention provides antibodies that specifically bind to a non-hgand binding region of the extracellular domain of one or more human Notch receptor, such as Notch2 and/or Notch3, and inhibit tumor growth. The present invention further provides methods of treating cancer, the methods comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-hgand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor protein and inhibits tumor growth.

WO 2010/005566 A2

NOTCH-BINDING AGENTS AND ANTAGONISTS AND METHODS OF USE THEREOF

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

[0001] The present invention relates to compositions comprising an agent that binds a human Notch receptor and methods of using those compositions for the treatment of cancer and other diseases. More specifically, the present invention provides, for example, antibodies that specifically bind to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibit tumor growth. The present invention further provides methods of treating cancer, the method comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor protein and inhibits tumor growth.

Background

[0002] The Notch signaling pathway is one of several critical regulators of embryonic pattern formation, post-embryonic tissue maintenance, and stem cell biology. More specifically, Notch signaling is involved in the process of lateral inhibition between adjacent cell fates and plays an important role in cell fate determination during asymmetric cell divisions. Unregulated Notch signaling is associated with numerous human cancers where it can alter the developmental fate of tumor cells to maintain them in an undifferentiated and proliferative state (Brennan and Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69). Thus carcinogenesis can proceed by usurping homeostatic mechanisms controlling normal development and tissue repair by stem cell populations (Beachy et al., 2004, *Nature* 432:324).

[0003] The Notch receptor was first identified in Drosophila mutants with haploinsufficiency resulting in notches at the wing margin, whereas loss-of-function produces an embryonic lethal "neurogenic" phenotype where cells of the epidermis switch fate to neural tissue (Moohr, 1919, *Genet.* 4:252; Poulson, 1937, *PNAS* 23:133; Poulson, 1940, *J. Exp. Zool.* 83:271). The Notch receptor is a single-pass transmembrane receptor containing numerous tandem epidermal growth factor (EGF)-like repeats and three cysteine-rich Notch/LIN-12 repeats within a large extracellular domain (Wharton et al., 1985, *Cell* 43:567; Kidd et al., 1986, *Mol. Cell Biol.* 6:3094; reviewed in Artavanis et al., 1999, *Science* 284:770). Four mammalian Notch proteins have been identified (Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4), and mutations in these receptors invariably result in developmental abnormalities and human pathologies including several cancers as described in detail below (Gridley, 1997, *Mol. Cell Neurosci.* 9:103; Joutel & Tournier-Lasserve, 1998, *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:619-25).

[0004] Notch receptors are activated by single-pass transmembrane ligands of the Delta, Serrated, Lag-2 (DSL) family. There are five known Notch ligands in mammals: Delta-like 1 (DLL1), Delta-like 3 (DLL3), Delta-like 4 (DLL4), Jagged 1 (JAG1) and Jagged 2 (JAG2) characterized by a DSL domain and

tandem EGF-like repeats within the extracellular domain. The extracellular domain of the Notch receptor interacts with that of its ligands, typically on adjacent cells, resulting in two proteolytic cleavages of Notch, one extracellular cleavage mediated by an ADAM (A Disintegrin And Metallopeptidase) protease and one cleavage within the transmembrane domain mediated by gamma secretase. This latter cleavage generates the Notch intracellular domain (ICD), which then enters the nucleus where it activates the CBF1, Suppressor of Hairless [Su(H)], Lag-2 (CSL) family of transcription factors as the major downstream effectors to increase transcription of nuclear basic helix-loop-helix transcription factors of the Hairy and Enhancer of Split [E(spl)] family (Artavanis et al., 1999, *Science* 284:770; Brennan and Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Iso et al., 2003, Arterioscler. *Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). Alternative intracellular pathways involving the cytoplasmic protein Deltex identified in Drosophila may also exist in mammals (Martinez et al., 2002, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:524-33), and this Deltex-dependent pathway may act to suppress expression of Wnt target genes (Brennan et al., 1999, *Curr. Biol.* 9:707-710; Lawrence et al., 2001, *Curr. Biol.* 11:375-85).

[0005] Mammalian Notch receptors undergo cleavage to form the mature receptor and also following ligand binding to activate downstream signaling. A furin-like protease cleaves the Notch receptors during maturation to generate juxtamembrane heterodimers that comprise a non-covalently associated extracelluar subunit and a transmembrane subunit held together in an auto-inhibitory state. Ligand binding relieves this inhibition and induces cleavage of the Notch receptor by an ADAM-type metalloprotease and a gamma-secretase, the latter of which releases the intracellular domain (ICD) into the cytoplasm, allowing it to translocate into the nucleus to activate gene transcription. Cleavage by ADAM occurs within the non-ligand binding cleavage domain within the membrane proximal negative regulatory region.

[0006] Hematopoietic stem cells (HSCs) are the best understood stem cells in the body, and Notch signaling is implicated in their normal maintenance as well as in leukemic transformation (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73). HSCs are a rare population of cells that reside in a stromal niche within the adult bone marrow. These cells are characterized both by a unique gene expression profile as well as an ability to continuously give rise to more differentiated progenitor cells to reconstitute the entire hematopoietic system. Constitutive activation of Notch1 signaling in HSCs and progenitor cells establishes immortalized cell lines that generate both lymphoid and myeloid cells *in vitro* and in long-term reconstitution assays (Varnum-Finney et al., 2000, *Nat. Med.* 6:1278-81), and the presence of Jagged1 increases engraftment of human bone marrow cell populations enriched for HSCs (Karanu et al., 2000, *J. Exp. Med.* 192:1365-72). More recently, Notch signaling has been demonstrated in HSCs *in vivo* and shown to be involved in inhibiting HSC differentiation. Furthermore, Notch signaling appears to be required for Wnt-mediated HSC self-renewal (Duncan et al., 2005, *Nat. Immunol.* 6:314).

[0007] The Notch signaling pathway also plays a central role in the maintenance of neural stem cells and is implicated in their normal maintenance as well as in brain cancers (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73; Purow et al., 2005, *Cancer Res.* 65:2353-63; Hallahan et al., 2004, *Cancer Res.* 64:7794-800). Neural stem cells give rise to all neuronal and glial cells in the mammalian nervous system during development, and more recently have been identified in the adult brain (Gage, 2000, *Science* 287:1433-8). Mice deficient for Notch1; the Notch target genes Hes1, 3, and 5; and a regulator of Notch signaling presenilin1 (PS1) show decreased numbers of embryonic neural stem cells. Furthermore, adult neural stem cells are reduced in the brains of PS1 heterozygote mice (Nakamura et al., 2000, *J. Neurosci.* 20:283-93; Hitoshi et al., 2002, *Genes Dev.* 16:846-58). The reduction in neural stem cells appears to result from their premature differentiation into neurons (Hatakeyama et al., 2004, *Dev.* 131:5539-50) suggesting that Notch signaling regulates neural stem cell differentiation and self-renewal.

[0008] Aberrant Notch signaling is implicated in a number of human cancers. The Notch1 gene in humans was first identified in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias as a translocated locus resulting in activation of the Notch pathway (Ellisen et al., 1991, *Cell* 66:649-61). Constitutive activation of Notch1 signaling in T-cells in mouse models similarly generates T-cell lymphomas suggesting a causative role (Robey et al., 1996, *Cell* 87:483-92; Pear et al., 1996, *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan et al., 2001, *Blood* 98:3793-9; Bellavia et al., 2000, *EMBO J.* 19:3337-48). Notch1 point mutations, insertions, and deletions producing aberrant Notch1 signaling have also been found to be frequently present in both childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33).

[0009] The frequent insertion of the mouse mammary tumor virus into both the Notch1 and Notch4 locus in mammary tumors and the resulting activated Notch protein fragments first implicated Notch signaling in breast cancer (Gallahan & Callahan, 1987, *J. Virol.* 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Further studies in transgenic mice have confirmed a role for Notch in ductal branching during normal mammary gland development, and a constitutively active form of Notch4 in mammary epithelial cells inhibits epithelial differentiation and results in tumorigenesis (Jhappan et al., 1992, *Genes & Dev.* 6:345-5; Gallahan et al., 1996, *Cancer Res.* 56:1775-85; Smith et al., 1995, *Cell Growth Differ.* 6:563-77; Soriano et al., 2000, *Int. J. Cancer* 86:652-9; Uyttendaele et al., 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Evidence for a role for Notch in human breast cancer is provided by data showing the expression of Notch receptors in breast carcinomas and their correlation with clinical outcome (Weijzen et al., 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr et al., 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86). Furthermore, overexpression of the Notch pathway has been observed in cervical cancers (Zagouras et al., 1995, *PNAS* 92:6414-8), renal cell carcinomas (Rae et al., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32), head and neck squamous cell carcinomas (Leethanakul et al., 2000, *Oncogene* 19:3220-4), endometrial cancers (Suzuki et al., 2000, *Int. J. Oncol.*

17:1131-9), and neuroblastomas (van Limpt et al., 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8), suggestive of a potential role for Notch in the development of a number of neoplasms. Interestingly, Notch signaling may play a role in the maintenance of the undifferentiated state of Apc-mutant neoplastic cells of the colon (van Es & Clevers, 2005, *Trends in Mol. Med.* 11:496-502).

[0010] The Notch pathway is also involved in multiple aspects of vascular development including proliferation, migration, smooth muscle differentiation, angiogenesis and arterial-venous differentiation (Iso et al., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). For example, homozygous null mutations in Notch1/4 and Jagged1 as well as heterozygous loss of DLL4 result in severe though variable defects in arterial development and yolk sac vascularization. Furthermore, DLL1-deficient and Notch2-hypomorphic mice embryos show hemorrhaging that likely results from poor development of vascular structures (Gale et al., 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs et al., 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue et al., 1999, *Hum. Mel. Genet.* 8:723-30; Hrabe de Angelis et al., 1997, *Nature* 386:717-21; McCright et al., 2001, *Dev.* 128:491-502). In humans, mutations in Jagged1 are associated with Alagille syndrome, a developmental disorder that includes vascular defects, and mutations in Notch3 are responsible for an inherited vascular dementia (Cadasil) in which vessel homeostasis is defective (Joutel et al., 1996, *Nature* 383:707-10).

[0011] Anti-Notch antibodies and their possible use as anti-cancer therapeutics have been previously reported. See, e.g., U.S. Patent Application Publication No. 2008/0131434, which is incorporated by reference herein in its entirety. See also International Publication Nos. WO 2008/057144 and WO 2008/076960, as well as U.S. Patent Application Publication Nos. 2008/0226621, 2008/0118520, and 2008/0131908.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention provides novel Notch-binding agents and novel antagonists of one or more human Notch receptors, as well as methods of using those agents and antagonists. The present invention further provides novel polypeptides, such as antibodies that bind one or more human Notch receptors, fragments of such antibodies, and other polypeptides related to such antibodies. In certain embodiments, the invention provides antagonists of human Notch2 and/or human Notch3, including, but not limited to, antibodies that specifically bind human Notch2 and/or human Notch3. As used herein, the phrase "Notch2 and/or Notch3" means "Notch2," "Notch3," or "both Notch2 and Notch3." In certain embodiments, the antibodies or other antagonists bind to a region of the Notch receptor that is outside of the ligand-binding domain (e.g., EGF10 of Notch2 or EGF9 of Notch3). In certain embodiments, the antibodies specifically bind human Notch2. In certain embodiments, the antibodies specifically bind both human Notch2 and human Notch3. In some embodiments, the antibodies specifically bind human Notch3. Polynucleotides comprising nucleic acid sequences encoding the polypeptides are also provided,

as are vectors comprising the polynucleotides. Cells comprising the polypeptides and/or polynucleotides of the invention are further provided. Compositions (e.g., pharmaceutical compositions) comprising the novel Notch antagonists are also provided. Methods of using the agents and antagonists are also provided, such as methods of using the Notch antagonists to inhibit tumor growth, reduce the tumorigenicity of tumors, inhibit angiogenesis, and/or treat cancer or other diseases associated with angiogenesis.

[0013] In one aspect, the invention provides an agent (e.g., an antibody) that specifically binds to an EGF10 domain (or an equivalent of an EGF10 domain) of one or more human Notch receptors. In certain embodiments, the agent is an antibody. In certain embodiments, the agent is an antagonist. In certain embodiments, the agent specifically binds to EGF10 of human Notch2 and/or EGF9 of human Notch3. EGF9 is the EGF within human Notch3 that is equivalent to EGF10 in the other human Notch receptors Notch1, Notch2, and Notch4. In some embodiments, the agent specifically binds to EGF10 of Notch 2. In some embodiments, the agent specifically binds to EGF10 of Notch 2 and to EGF9 of Notch 3. In some embodiments, the agent specifically binds to EGF9 of Notch 3. In other embodiments, the agent binds to at least part of the sequence HKGAL (SEQ ID NO:28) within Notch2 EGF10. In some embodiments, the agent binds to at least part of the sequence HEDAI (SEQ ID NO:29) within Notch3 EGF9.

[0014] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the agent inhibits binding of a ligand to human Notch2 and/or Notch3. In some embodiments, the agent inhibits binding of a ligand to human Notch2. In some embodiments, the agent inhibits binding of a ligand to Notch2 and Notch3. In other embodiments, the agent inhibits binding of a ligand to Notch3. In certain embodiments, the ligand is DLL4, JAG1 or JAG2. In other embodiments, the agent inhibits signaling of human Notch2 and/or Notch3. In some embodiments, the agent inhibits signaling of human Notch2. In some embodiments, the agent inhibits signaling of Notch2 and Notch3. In other embodiments, the agent inhibits signaling of Notch3. In some embodiments Notch2 and/or Notch3 signaling is induced by DLL4, JAG1 or JAG2. Pharmaceutical compositions comprising the agent and methods of using the agent for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0015] In a further aspect, the invention provides an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and/or a heavy chain CDR3 comprising SIFYTT (SEQ ID NO:51); and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). In some embodiments, the antibody comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), or a variant thereof comprising

1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or a heavy chain CDR3 comprising SIFYTT (SEQ ID NO:51), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions. Pharmaceutical compositions comprising the antibody and methods of using the antibody for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0016] In a further aspect, the invention provides an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and/or a heavy chain CDR3 comprising GIFFAI (SEQ ID NO:7); and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). In certain embodiments, the antibody specifically binds Notch2. In some embodiments, the antibody comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or a heavy chain CDR3 comprising GIFFAI (SEQ ID NO:7), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions. Pharmaceutical compositions comprising the antibody and methods of using the antibody for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0017] In another aspect, the invention provides an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and/or a heavy chain CDR3 comprising (G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30); and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). In some embodiments, the antibody

comprises a heavy chain CDR3 comprising SIFYPT (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR3 comprising SSSFFAS (SEQ ID NO:23). In other embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR3 comprising SSFYAS (SEQ ID NO:24). In certain embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR3 comprising SSFFAT (SEQ ID NO:25). In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR3 comprising SIFYPS (SEQ ID NO:26). In yet other embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR3 comprising SSFFAN (SEQ ID NO:27). Pharmaceutical compositions comprising the antibody and methods of using the antibody for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0018] In another aspect, the invention provides a polypeptide that comprises: (a) a polypeptide (e.g., a heavy chain variable region) having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, or SEQ ID NO:20 (with or without signal sequence); and/or (b) a polypeptide (e.g., a light chain variable region) having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:39 (with or without signal sequence). In certain embodiments, the polypeptide is an antibody. In certain embodiments, the polypeptide specifically binds human Notch2 and/or Notch3. In some embodiments, the polypeptide specifically binds to human Notch2. In some embodiments, the polypeptide binds to Notch2 and Notch3. In other embodiments, the polypeptide binds to Notch3. In certain embodiments, the polypeptide comprises a polypeptide having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 98%, or about 100% sequence identity to SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:50. Pharmaceutical compositions comprising the polypeptide and methods of using the polypeptide for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0019] In still another aspect, the invention provides a polypeptide (e.g., an antibody or a heavy chain or light chain of an antibody) comprising: (a) a polypeptide having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:16, or SEQ ID NO:2 (with or without signal sequence); and/or (b) a polypeptide having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:4 (with or without signal sequence. In certain embodiments, the polypeptide comprises a polypeptide having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 98%, or about 100% sequence identity to SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:40. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies and methods of treating cancer comprising administering therapeutically effective amounts of the antibodies are also provided.

[0020] In another aspect, the invention provides a polypeptide (e.g., an antibody or a heavy chain or light chain of an antibody) comprises: (a) a polypeptide having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:50; and/or (b) a polypeptide having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:13. In

certain embodiments, the polypeptide comprises a polypeptide having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 98%, or about 100% sequence identity to SEQ ID NO:50 or SEQ ID NO:13. In certain embodiments, the polypeptide is an antibody that binds human Notch2 and/or human Notch3. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies and methods of treating cancer comprising administering therapeutically effective amounts of the antibodies are also provided.

[0021] In another aspect, the invention provides an antibody that comprises, consists, or consists essentially of a 59R1 IgG2 antibody comprising the heavy chain and light chain of SEQ ID NOs:16 and 18 (with or without signal sequence), respectively, or as encoded by the DNA deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, under the conditions of the Budapest Treaty on October 15, 2008, and assigned designation number PTA-9547. Pharmaceutical compositions comprising the antibody and methods of using the antibody for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0022] In an additional aspect, the invention provides an antibody that comprises, consists or consists essentially of a 59R5 IgG2 antibody comprising the heavy chain and light chain of SEQ ID NO:49 and SEQ ID NO:18 (with or without signal sequence), respectively, or as encoded by the DNA deposited with the ATCC on July 6, 2009, and assigned designation number [...]. Pharmaceutical compositions comprising the antibody and methods of using the antibody for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0023] In another aspect, the invention provides an antibody that competes for specific binding to human Notch2 and/or Notch3 with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:14 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:13. In certain embodiments, the antibody competes for specific binding with a 59R1 IgG2 antibody comprising the heavy chain and light chain of SEQ ID NOs:16 and 18 (with or without signal sequence), respectively, or as encoded by the DNA deposited with the ATCC on October 15, 2008, and assigned designation number PTA-9547. In some embodiments, the antibody competes for binding to human Notch2. In some embodiments, the antibody competes for binding to human Notch2 and Notch3. In other embodiments, the antibody competes for binding to human Notch3. Pharmaceutical compositions comprising the antibody and methods of using the antibody for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0024] In a further aspect, the antibody competes for specific binding to human Notch2 and/or Notch3 with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:50 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:13. In some embodiments, the antibody competes for specific binding with a 59R5 antibody comprising the heavy chain and light chain of SEQ ID NOs: 49 and 18, respectively, or as encoded by the DNA deposited with the ATCC on July 6, 2009, and assigned

designation number [...]. In some embodiments, the antibody competes for binding to human Notch2. In some embodiments, the antibody competes for binding to human Notch2 and Notch3. In other embodiments, the antibody competes for binding to human Notch3. Pharmaceutical compositions comprising the antibody and methods of using the antibody for such uses as inhibiting angiogenesis, inhibiting tumor growth, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or treating cancer are also provided.

[0025] In certain other aspects, the invention provides a polypeptide (with or without a signal sequence) comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, and SEQ ID NO:57, as well as a polynucleotide encoding such a polypeptide. In certain embodiments, the polypeptide is an antibody. In certain embodiments, the antibody specifically binds to human Notch2 and/or human Notch3. In certain embodiments, the antibody specifically binds to human Notch2. In certain embodiments, the antibody specifically binds to human Notch2 and human Notch3. In certain embodiments, the antibody specifically binds to human Notch3. In another aspect, the invention provides a polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO: 59 and SEQ ID NO:60.

[0026] In another aspect, the invention provides a method of modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells in a subject (e.g., at the site of a tumor or other aberrant angiogenesis in the subject). In certain embodiments, the method comprises administering an effective amount of an agent that specifically binds human Notch2 and/or human Notch3 to the subject. In certain embodiments, the agent is an antibody. In some embodiments, the agent is an antibody described in any one of the aforementioned aspects and/or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described herein. In certain embodiments, the agent is an antagonist. In certain embodiments, the agent specifically binds to and is an antagonist of human Notch3. In certain embodiments, the modulation of the function of the pericytes and/or vascular smooth muscle cells results in inhibition of angiogenesis and/or tumor growth.

[0027] In still another aspect, the invention provides a method of inhibiting angiogenesis (e.g., tumor angiogenesis) in a subject. In certain embodiments, the method comprises administering to the subject an effective amount of an agent that specifically binds human Notch2 and/or human Notch3. In certain embodiments, the agent is an antagonist. In some embodiments, the agent specifically binds to and is an antagonist of human Notch2. In certain embodiments, the agent specifically binds to and is an antagonist of human Notch3. In some embodiments, the agent is an antagonist of both Notch2 and Notch3. In some embodiments, the antagonist is an antibody. In certain embodiments, the agent is an antibody. In some embodiments, the agent is an antibody described in any one of the aforementioned aspects and/or

embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described herein. In some embodiments, the antagonist is not an antibody. In some embodiments, the method of inhibiting angiogenesis further comprises administering to the subject an antagonist of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) or of a VEGF receptor. In certain embodiments, the method is a method of inhibiting angiogenesis by modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells.

[0028] In a further aspect, the invention provides a method of inhibiting growth of a tumor in a subject. In certain embodiments, the method comprises administering to the subject a therapeutically effective amount of an antagonist of human Notch2 and/or human Notch3. In certain embodiments, the antagonist is an antibody that specifically binds human Notch2. In some embodiments, the antagonist is an antibody that specifically binds both human Notch2 and human Notch3. In certain embodiments, the antagonist is an antibody that specifically binds human Notch3. In some embodiments, the antagonist is an antibody described in any one of the aforementioned aspects and/or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described herein. In certain embodiments, the tumor comprises a deletion or other mutation in the phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene. In certain embodiments, the tumor is a breast tumor.

[0029] In a still further aspect, the invention provides a method of selecting a subject for treatment with a human Notch2 and/or human Notch3 antagonist. In certain embodiments, the method comprises (a) determining if the tumor comprises a deletion or mutation in the phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene; and (b) selecting the subject for treatment with a Notch2 and/or Notch3 antagonist if the tumor comprises the deletion or mutation. In some embodiments, the subject is treated with a Notch2 antagonist. In some embodiments, the subject is treated with an antagonist of Notch2 and Notch3. In some embodiments, the subject is treated with an antagonist of Notch3. In some embodiments the antagonist is an antibody. In certain embodiments, the tumor is a breast tumor.

[0030] In another aspect, the invention provides an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of at least one human Notch receptor (e.g., 1, 2, 3, or 4 Notch receptors). In certain embodiments, the non-ligand binding region comprises or consists of EGF repeat 10 of a human Notch receptor (or an equivalent of EGF10, such as EGF9 of human Notch3). In some embodiments, the antibody inhibits tumor growth. In some embodiments, the antibody inhibits binding of a ligand to a Notch receptor. In certain embodiments, the antibody inhibits signaling by the Notch receptor. In some embodiments, the Notch receptor is a human Notch1, Notch2, Notch3, or Notch4 receptor. In certain embodiments, the antibody specifically binds to Notch2 (for example, EGF10 of Notch2). In certain embodiments, the antibody specifically binds to Notch2 and at least one additional Notch receptor. In certain embodiments, the additional Notch receptor is Notch3. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies and methods of treating cancer comprising administering therapeutically effective amounts of the antibodies are also provided.

[0031] In an additional aspect, the invention provides an antibody that specifically binds to two or more (i.e., at least two or two, three, or four) human Notch receptors. In certain embodiments, the antibody specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of the two or more human Notch receptors. In certain embodiments, if the two or more human Notch receptors comprise Notch1, Notch2, or Notch4, the antibody binds to EGF10 of Notch1, Notch2, or Notch4, and if the two or more human Notch receptors comprise Notch3, the antibody binds to EGF9 of Notch3. In certain embodiments, the non-ligand binding region is not EGF4. In certain embodiments, the two or more human Notch receptors comprise Notch2. In certain embodiments, the two or more human Notch receptors comprise Notch3. In still further embodiments, the two or more human Notch receptors comprise Notch2 and Notch3. In certain embodiments, the antibody is an antagonist of the two or more human Notch receptors. In certain embodiments, the antibody inhibits tumor growth. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies and methods of treating cancer comprising administering therapeutically effective amounts of the antibodies are also provided.

[0032] In yet another aspect, the invention provides an isolated antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch2 receptor and inhibits tumor growth, wherein the non-ligand binding region comprises or consists of EGF repeat 10 of the human Notch2 receptor (e.g., SEQ ID NO:36). In some embodiments, the antibody does not bind to any region of human Notch2 outside of EGF repeat 10. In certain embodiments, the antibody also specifically binds to EGF repeat 10 (or equivalent) of at least one additional human Notch receptor (e.g., EGF9 of Notch3). In some embodiments, the antibody binds to human Notch2 EGF10 and Notch3 EGF9. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies and methods of treating cancer comprising administering therapeutically effective amounts of the antibodies are also provided.

[0033] In yet another aspect, the invention provides an isolated antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch3 receptor and inhibits tumor growth, wherein the non-ligand binding region comprises or consists of EGF repeat 9 of the human Notch3 receptor (equivalent to EGF10 in the other Notch receptors). In some embodiments, the antibody does not bind to any region of human Notch3 outside of EGF repeat 9. In certain embodiments, the antibody also specifically binds to EGF repeat 10 of at least one additional human Notch receptor. In some embodiments, the antibody binds to human Notch3 EGF9 and Notch2 EGF10. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies and methods of treating cancer comprising administering therapeutically effective amounts of the antibodies are also provided.

[0034] In a still further aspect, the invention provides an antibody that binds a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor and comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and/or a heavy chain CDR3 comprising GIFFAI (SEQ ID NO:7); and/or (b) a light chain

CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). In certain embodiments, the human Notch receptor is Notch2. In certain embodiments, the antibody binds to EGF10 of a human Notch2 receptor and/or EGF9 of a human Notch3 receptor. In an additional aspect, the invention provides an antibody that competes with such an antibody for specific binding to a non-ligand binding region of an extracellular domain of Notch2 in a competitive binding assay. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies and methods of treating cancer comprising administering therapeutically effective amounts of the antibodies are also provided. Methods of inhibiting angiogenesis comprising administering the compositions are also provided.

[0035] In another aspect, the invention provides an antibody that binds a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor and comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and/or a heavy chain CDR3 comprising SIFYTT (SEQ ID NO:51); and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). In certain embodiments, the human Notch receptor is Notch2. In some embodiments, the antibody binds to the human Notch2 and Notch3 receptors. In certain embodiments, the antibody binds to EGF10 of a human Notch2 receptor and/or EGF9 of a human Notch3 receptor. In another embodiment, the invention provides an antibody that competes with such an antibody for specific binding to a non-ligand binding region of an extracellular domain of Notch2 in a competitive binding assay. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies and methods of treating cancer comprising administering therapeutically effective amounts of the antibodies are also provided. Methods of inhibiting angiogenesis comprising administering the compositions are also provided.

[0036] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the antibody specifically binds to both human Notch2 and human Notch3.

[0037] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the antibody is a recombinant antibody. In certain embodiments, the antibody is a monoclonal antibody. In certain embodiments, the antibody is a chimeric antibody. In certain embodiments, the antibody is a humanized antibody. In certain embodiments, the antibody is a human antibody. In some embodiments, the antibody is monovalent, bivalent or multivalent. In certain embodiments, the antibody is a monospecific antibody. In certain embodiments, an individual antigen-binding site of the antibody binds (or is capable of binding) a non-ligand binding region of the extracellular domain of more than one human Notch receptor (e.g., Notch2 and Notch3). In certain alternative embodiments, the antibody is a bispecific antibody. In certain

embodiments, the antibody is an IgG1 antibody. In certain embodiments, the antibody is an IgG2 antibody. In certain embodiments, the antibody is conjugated to a cytotoxic moiety. In certain embodiments, the antibody is isolated. In still further embodiments, the antibody is substantially pure.

[0038] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the cancer or tumor treated with the antibody is a breast, colorectal, lung, pancreatic, prostate, or head and neck cancer or tumor. In certain embodiments, the cancer or tumor is melanoma. In certain embodiments, the cancer or tumor is a breast cancer or tumor. In certain embodiments, the cancer or tumor is a colorectal cancer or tumor. In certain embodiments, the cancer or tumor is a pancreatic cancer or tumor. In certain embodiments, the cancer or tumor is a prostate cancer or tumor.

[0039] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the methods of treating cancer comprise inhibiting tumor growth. In certain embodiments, the methods of treating cancer comprise reducing the tumorigenicity of tumors (e.g., by reducing the frequency of cancer stem cells in the tumor).

[0040] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the antagonist or antibody is administered to a subject in combination with an additional treatment for cancer. In certain embodiments, the additional treatment for cancer comprises radiation therapy, chemotherapy, and/or an additional antibody therapeutic. In some embodiments, the additional treatment for cancer comprises a chemotherapeutic agent. In certain embodiments, the chemotherapy comprises paclitaxel (e.g., TAXOL), irinotecan, gemcitabine, and/or oxaliplatin. In certain embodiments, the additional antibody therapeutic is an antibody that specifically binds a human Notch receptor (e.g., Notch1, 2, 3, or 4) or a human Notch receptor ligand (e.g., DLL4 or JAG1). In some embodiments, the additional antibody therapeutic is an anti-DLL4 antibody. In certain alternative embodiments, the additional antibody therapeutic is an antibody that specifically binds vascular endothelial cell growth factor (VEGF). In certain embodiments, the additional therapeutic binds a VEGF receptor.

[0041] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the antibody is administered to a subject in combination with a second therapeutic agent that is an anti-angiogenic agent.

[0042] Cell lines (e.g., hybridoma cell lines) comprising or producing the antibodies or other polypeptides described herein are further provided by the invention. Polynucleotides (e.g., vectors) comprising the polynucleotides described herein, including polynucleotides encoding the polypeptides or the light chain variable regions or heavy chain variable regions of the antibodies described herein are also provided, as are cell lines comprising such polynucleotides.

[0043] In certain embodiments, the present invention provides a method of treating cancer, wherein the cancer comprises cancer stem cells, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody which binds a Notch receptor. In a more particular aspect, the present invention provides a method of treating cancer, wherein the cancer comprises stem cells expressing one or more Notch receptor family members, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody that binds those Notch receptor family members. The present invention provides antibodies that bind to the non-ligand binding domain of the extracellular domain of a human Notch receptor and are therapeutically effective against cancer. Thus, in certain embodiments, the present invention provides an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and that inhibits tumor growth. In certain embodiments, the present invention further provides a method of treating cancer, the method comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor protein and inhibits tumor growth.

[0044] Various advantages in using an antibody that binds Notch receptor family members or the ligands to those Notch receptors to treat such cancers are contemplated herein. In some embodiments, certain Notch receptors are highly expressed in certain solid tumors, for example, breast and colon, and this provides a sink for active drug where the drug binds to the Notch receptor. Antibodies that bind overexpressed Notch receptors are anticipated to have a better safety profile than currently available chemotherapeutic drugs.

[0045] The invention further provides a method of treating cancer in a human, wherein the cancer comprising cancer stem cells is not characterized by overexpression by the cancer stem cell of one or more Notch receptors, comprising administering to the human a therapeutically effective amount of an antibody which binds to a Notch receptor and blocks ligand activation of a Notch receptor.

[0046] The invention further provides a method of treating cancer in a human comprising administering to the human therapeutically effective amounts of (a) a first antibody which binds a Notch receptor and inhibits growth or proliferation of cancer stem cells which overexpress Notch receptors; and (b) a second antibody which binds a Notch receptor and blocks ligand activation of a Notch receptor.

[0047] The invention also provides a method of treating cancer, wherein the cancer is selected from the group consisting of breast, colon, rectal and colorectal cancer, comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody which binds Notch. The invention also provides another method of treating cancer, wherein the cancer is selected from the group consisting of breast, colon, pancreatic, prostate, lung, rectal and colorectal cancer, comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody that blocks ligand activation of a Notch receptor. The invention also provides still another method of treating cancer, wherein the cancer is selected from the group consisting of breast, colon, pancreatic, prostate, lung, rectal and colorectal cancer, comprising administering a therapeutically

effective amount of an antibody that binds Notch and an antibody that blocks ligand activation of a Notch receptor.

[0048] In further embodiments, the invention provides articles of manufacture for use (among other things) in the above methods. For example, the invention provides an article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody that binds Notch, and further comprises a package insert indicating that the composition can be used to treat a cancer comprising cancer stem cells. In some embodiments, the invention provides an article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody that binds Notch, and further comprises a package insert indicating that the composition can be used to treat cancer comprising cancer stem cells that express one or more Notch receptors.

[0049] In certain embodiments, the invention additionally pertains to an article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody which binds a Notch receptor and blocks ligand activation of a Notch receptor, and further comprises a package insert indicating that the composition can be used to treat cancer, wherein the cancer comprises cancer stem cells that are not characterized by overexpression of the Notch receptor.

[0050] In certain embodiments, an article of manufacture is provided which comprises (a) a first container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a first antibody that binds a Notch receptor and inhibits growth of cancer cells comprising cancer stem cells overexpressing Notch; and (b) a second container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a second antibody which binds Notch and blocks ligand activation of a Notch receptor.

[0051] In some embodiments, a further article of manufacture is provided which comprises a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody which binds Notch and blocks ligand activation of a Notch receptor, and further comprises a package insert indicating that the composition can be used to treat a cancer selected from the group consisting of colon, pancreatic, prostate, lung, rectal and colorectal cancer.

[0052] The invention additionally provides: an antibody (e.g., a human antibody or a humanized antibody) which binds Notch and blocks ligand activation of a Notch receptor; a composition comprising the antibody and a pharmaceutically acceptable carrier; and an immunoconjugate comprising the antibody conjugated with a cytotoxic agent.

[0053] In one aspect, the invention provides an isolated polynucleotide encoding any of the antibodies or polypeptides of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein. In some embodiments, the invention provides a vector comprising the polynucleotide. In some embodiments, a host cell comprises the polynucleotide or the vector. In other embodiments, a process of producing the antibody comprises culturing a host cell comprising the

polynucleotide so that the polynucleotide is expressed and, optionally, further comprises recovering the antibody from the host cell culture (e.g., from the host cell culture medium).

[0054] Moreover, the invention provides an isolated polynucleotide encoding a humanized or human antibody as described in the aforementioned embodiments or aspects, as well as described elsewhere herein; a vector comprising the polynucleotide; a host cell comprising the polynucleotide or the vector; as well as a process of producing the antibody comprising culturing a host cell comprising the polynucleotide so that the polynucleotide is expressed and, optionally, further comprising recovering the antibody from the host cell culture (e.g., from the host cell culture medium).

[0055] The invention further pertains to an immunoconjugate comprising an antibody that binds Notch conjugated to one or more calicheamicin molecules, and the use of such conjugates for treating a Notch expressing cancer, e.g., a cancer in which cancer stem cells overexpress Notch.

[0056] Where aspects or embodiments of the invention are described in terms of a Markush group or other grouping of alternatives, including, but not limited to, groups of alternatives separated by "and/or" or "or," the present invention encompasses not only the entire group listed as a whole, but each member of the group individually and all possible subgroups of the main group, but also the main group absent one or more of the group members. The present invention also envisages the explicit exclusion of one or more of any of the group members in the claimed invention. For example, language such as "X and/or Y" encompasses "X" individually, "Y" individually, as well as "X" and "Y" together.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS/FIGURES

[0057] Figure 1: 59R1 antibodies and variants bind human Notch2 and block ligand binding. (A) FACS analysis of binding by 59R1 Fab to human Notch2. "Clone 1" is 59R1 Fab which was shown to bind human Notch2 on stably transfected HEK293 cells. "Clone 5" is the Fab of a different clone isolated from the phage library which did not bind Notch2. (B) FACS analysis of blocking of ligand (JAG1) binding by 59R1 Fab. "Clone 1" is 59R1 Fab which was shown to block binding of a hJagged1 ECD-Fc fusion to human Notch2 on stably transfected HEK293 cells. "Clone 5" is the Fab of a different clone isolated from the phage library which did not block ligand binding in the assay. (C) FACS analysis of binding of 59R1 IgG2 antibody to human Notch2 on stably transfected HEK293 cells. 59R1 IgG2 antibody was shown to bind human Notch2 on stably transfected HEK293 cells. (D) FACS analysis of blocking of ligand (DLL4) binding by 59R1 IgG2 antibody. 59R1 IgG2 antibody was shown to block binding of a hDLL4 ECD-Fc fusion to human Notch2 on stably transfected HEK293 cells. (E) Affinity maturation strategy for heavy chain CDR3 of 59R1. The parental sequence of the heavy chain CDR3 of 59R1 is shown boxed. Allowed residue changes are as indicated below the parental sequence in the figure. (F) Screening of affinity maturated 59R1 sequences for JAG1 blocking ability. Improved variants are indicated with arrows.

[0058] Figure 2: FACS analysis of cross-reactivity of the 59R1 IgG2 antibody to the four human Notch homologues. 59R1 was found to bind hNotch2 and hNotch3 on transiently transfected HEK-293 cells but was found to not exhibit significant binding to hNotch1 and hNotch4 on the same cells.

[0059] Figure 3: Epitope mapping of 59R1 antibody. (A) Anti-Notch2/3 antibody 59R1 binds to EGF repeat 10 of human Notch2. Supernatant from HEK 293 cells expressing recombinant Notch2-Fc fusion proteins with the indicated EGF repeats of Notch2 between 1 and 12 (x-axis) were used in ELISA with anti-Notch2/3 antibody 59R1. The OD (y-axis) indicated antibody binding (hatched bars) only to Notch2 fusion proteins comprising EGF repeat 10. (The figure shows data obtained from two separate experiments which are shown separately in the top and bottom graphs.) (B) EGF Repeats 11 and 12 are not involved in anti-Notch2/3 antibody 59R1 binding to full length hNotch2. FACS analysis of HEK 293 cells transfected with green fluorescent protein (GFP) (x-axis) alone (top left) or co-transfected with GFP and either full length Notch2 intact or with full length Notch 2 with EGF repeat 11 deleted (ΔEGF11) or EGF repeat 12 deleted (ΔEGF12). Binding of 59R1 is indicated along the y-axis (PE) to all three Notch2 proteins in GFP-expressing cells. (C) EGF repeat 10 is involved in anti-Notch2/3 antibody 59R1 binding to full-length hNotch2, but not in ligand binding. Binding by an anti-Notch2 antibody 59M70 that binds to EGF1-4 of hNotch2 is indicated as "anti-Notch2 binding." Binding by DLL4 is indicated as "ligand binding."

[0060] Figure 4: Anti-Notch2/3 antibody 59R1 inhibits Notch2 signaling in luciferase reporter assays. (A) 59R1 blocks hDLL4-induced Notch2 reporter activity. (B) 59R1 blocks hJAG1-induced Notch2 reporter activity (C) 59R1 blocks hJAG2-induced Notch2 reporter activity

[0061] Figure 5: Notch2/3 Receptor Antibody 59R1 Inhibits Tumor Formation and Growth *In vivo*. (A) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibits the Formation of PE13 Breast Tumors. NOD/SCID mice injected with PE13 breast tumor cells were treated with control antibody (squares) or anti-Notch2/3 antibody 59R1 (open triangles) two days after cell injection and tumor volume (y-axis, mm^3) was measured across time (x-axis, days post cell injection). Treatment with 59R1 antibodies significantly inhibited tumor formation compared to control. ($p < 0.001$) (B) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibits Formation of T3 Breast Tumors. NOD/SCID mice injected with T3 breast tumor cells were treated with control antibody (squares) or anti-Notch2/3 antibody 59R1 (open triangles) two days after cell injection, and tumor volume (y-axis, mm^3) was measured across time (x-axis, days post cell injection). Treatment with 59R1 antibodies significantly inhibited tumor formation compared to control. ($p < 0.001$) (C) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibits the Growth of Colo-205 Colon Tumors. 6-8 week-old immunodeficient *bg/nu XID* female mice on a Swiss CD-1 background injected with Colo-205 colon tumor cells were treated with control antibody (squares) or anti-Notch2/3 antibody 59R1 (diamonds) after tumor volume reached a size between 65 to 200 mm^3. Mean tumor volume (y-axis, mm^3) was measured across time (x-axis, days post cell injection). Treatment with 59R1 antibodies inhibited tumor growth compared to control (*** $p < 0.001$ after day 40). (D) Anti-

Notch2/3 (59R1) Inhibits the Growth of PN4 Pancreatic Tumors. NOD/SCID mice injected with PN4 pancreatic tumor cells were treated with control antibody (squares) or anti-Notch2/3 antibody 59R1 (diamonds) after tumor volume reached an a size between 65 to 200 mm^3. Mean tumor volume (y-axis, mm^3) was measured across time (x-axis, days post cell injection). Treatment with 59R1 antibodies inhibited tumor growth compared to control (*** $p < 0.001$ after day 70). (E) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibits the Growth of PE13 Breast Tumors. NOD/SCID mice injected with PE13 breast tumor cells were treated with control antibody (squares) or anti-Notch2/3 antibody 59R1 (diamonds) after tumor volume reached a size between 65 to 200 mm^3. Mean tumor volume (y-axis, mm^3) was measured across time (x-axis, days post cell injection). Treatment with 59R1 antibodies inhibited tumor growth compared to control (* $p < 0.05$ after day 57). (F) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibits the Growth of T3 Breast Tumors. NOD/SCID mice injected with T3 breast tumor cells were treated with control antibody (solid bars) or anti-Notch2/3 antibody 59R1 (open bars) after tumor volume reached a size between 65 to 200 mm^3. Mean tumor volume was measured on days 18, 25, 39, and 42 post cell injection. Treatment with 59R1 antibodies inhibited tumor growth compared to control (*** $p < 0.001$ on day 42).

[0062] Figure 6: Anti-Notch2/3 antibody 59R1 delays B51 breast tumor recurrence after paclitaxel treatment.

[0063] Figure 7: Anti-Notch2/3 antibody 59R1 decreases cancer stem cell frequency in B51 breast tumor.

[0064] Figure 8: In combination with gemcitabine, anti-Notch2/3 antibody 59R1 inhibits the growth of PN4 pancreatic tumors.

[0065] Figure 9: Anti-Notch2/3 antibody 59R1 inhibits tumor growth in an M4 melanoma xenograft model.

[0066] Figure 10: Anti-Notch2/3 antibody 59R1 inhibits the growth of C28 colon tumors alone and in combination with irinotecan.

[0067] Figure 11: 59R1 IgG2 antibody significantly inhibits tumor growth of established human tumor xenografts *in vivo*. Established Colo-205 (A), C8 (B), PN8 (C), B34 (D), B39 (E), B44 (F), PE-13 (G) and T1 (H) tumors (s.c, n=10 per group) were treated at 15mg/kg once a week with the indicated antibodies (1B711, LZ-1 control antibody, black squares; 59R1, black triangles; AVASTIN, black circles; AVASTIN + 59R1, black diamonds). Tumor volume (x-axis) is plotted over time (y-axis). In the Colo-205 xenograft model, combination therapy of 59R1 with AVASTIN was significantly more effective than either antibody treatment alone. In Figures 11B-11H, asterisks indicate significant tumor-growth inhibition at day shown: *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$, Student's t-test; Symbols, mean; bars, SEM.

[0068] Figure 12: Relative expression levels of selected genes are significantly regulated by 59R1 treatment in various xenograft tumor models. Expression levels of HEYL (A), Notch3 (B), RGS5 (C),

ANGPT1 (D) and ANGPT2 (E) were individually tested by TaqMan® analysis from previously tested xenograft models. Notably, lack of estrogen (ne) abrogates effect of 59R1 in reducing ANGPT1 and ANGPT2 expression in host stroma of T1 harboring mice. Open circles correspond to individual tumors analyzed. Horizontal line, mean.

[0069] Figure 13: The tumor suppressor PTEN gene is deleted in many of the breast tumors in which 59R1 showed anti-tumor efficacy. The PTEN exon, Affymetrix probe distribution, and the deletions in the PTEN gene in chromosome 10 are shown. The thick and thin gray-shaded bars indicate the homozygous and heterozygous deletions of the chromosome fragments, respectively.

[0070] Figure 14. Epitope mapping of 59R1 antibody. (A) Protein alignment of human Notch homologues. The alignment was performed by Clone Manager Software. The EGF 10 repeat of human Notch1, Notch2, and Notch4 and the equivalent EGF in human Notch3, EGF9, is as indicated. The boxed area indicates a region containing one or more amino acid(s) that make up at least part of the 59R1 epitope as defined by FACS binding of 59R1 IgG2 antibody to an hNotch2 H385N AL 388-89 SN mutant (Figure 14B) and to an hNotch1 construct in which aa 382-386 have been mutated to correspond to the hNotch2 sequence (Figure 14C). (B) 59R1 IgG2 antibody binds to hNotch2, but not a mutant hNotch2 in which certain EGF 10 residues have been mutated to hNotch1 residues (H385N AL 388-89 SN). (C) 59R1 IgG2 antibody does not bind to hNotch1, but does bind to a mutant hNotch1 in which certain EGF 10 residues (aa 382-387) have been mutated to match the hNotch2 residues 385-389.

[0071] Figure 15. *In vitro* characterization of 59R5. (A) Figure 15A shows that antibody 59R5 is able to block ligand–induced signaling of Notch2 and Notch3. PC3 tumor cells were transiently transfected with human or mouse Notch receptor (hN2, human Notch2; mN2, murine Notch2; hN3, human Notch3; mN3, murine Notch3) and GFP inducible reporter construct. Transfected cells were incubated with different concentrations of antibody 59R1 and 59R5 in the presence of passively immobilized DLL4 Fc. (B) Figure 15B shows that 59R5 binds to a similar epitope as 59R1. HEK 293 cells were transiently transfected with expression vectors encoding human Notch2, human Notch1, or human Notch1 with residues 382-386 mutated to the corresponding human Notch2 residues. Cells were also co-transfected with a plasmid encoding green fluorescent protein (GFP) to mark those cells that received transfected plasmid. Cells were incubated with 59R1 or 59R5 and fluorescent secondary antibody and then examined by FACS. The regions highlighted by the boxes suggest that cells transfected with the indicated Notch expression vector were able to bind to 59R1 or 59R5.

[0072] Figure 16. Notch receptor antibody 59R5 inhibits tumor formation and growth *in vivo*. Figure 16A shows *in vivo* treatment of PE13 breast tumor cells with antibody 59R5. Figure 16B shows *in vivo* treatment of C28 colon cells with antibody 59R5. Figure 16C shows *in vivo* treatment of Colo205 colon cells with antibody 59R5.

[0073] Figure 17. *In vivo* treatment of tumors using Notch2/3 antibody 59R5 in combination treatment. (A) Mice were injected with PN8 pancreatic tumor cells. Tumors were allowed to grow for 33 days until they had reached an average volume of 120 mm3. The animals were treated with gemcitabine at 20 mg/kg once per week for four week in combination with either control Ab (squares), 59R1 (triangles), or 59R5 (circles). (B) Mice were injected with PE13 breast tumor cells. Tumors were allowed to grow for 40 days before treatments were initiated. The animals were treated with TAXOL at 15 mg/kg twice per week for 5 weeks, plus either control antibody (squares) or 59R5 (circles). After 5 weeks, the TAXOL treatments were stopped and the antibody treatments continued.

[0074] Figure 18. Regulation of gene expression in tumors after treatment with antibody 59R5. Figure 18 shows expression levels of selected genes in stromal cells and selected human genes in PE13 tumor cells after treatment with 59R1, 59R5, or control antibody.

[0075] Figure 19. Reduction of PE13 breast cancer stem cell frequency by 59R1. (A) Established tumors were treated with control antibody, taxol plus control antibody, 59R1, or taxol plus 59R1. Tumors were harvested after three weeks of treatment, processed and serial titrations of human cells from each the four treatment groups were transplanted into a new set of mice (n =10 per cell dose). Tumor growth rate was determined after 75 days. Tumor growth rate after 75 days of growth was used to calculate the CSC frequency using the L-calc program (Stem Cell Technologies, Inc.). (B) Cancer stem cell frequency in PE13 breast tumors after treatment with 59R1 and/or taxol. (C) Cancer stem cell frequency in PN4 pancreatic tumors after treatment with 59R1 and/or gemcitabine. (D) Cancer stem cell frequency in PE13 breast tumors after treatment with 59R5 and/or taxol. A single asterisk indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) vs. the control antibody treated group and a double asterisk indicates a significant difference vs. the taxol and control antibody treated group.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0076] The present invention provides novel agents, including, but not limited to polypeptides such as antibodies, that bind to one or more human Notch receptors, such as Notch2 and/or Notch3. The Notch-binding agents include antagonists of the human Notch receptor(s). Related polypeptides and polynucleotides, compositions comprising the Notch-binding agents, and methods of making the Notch-binding agents are also provided. Methods of using the novel Notch-binding agents, such as methods of inhibiting tumor growth, inhibiting angiogenesis, and/or treating cancer or other angiogenesis-related disease, are further provided.

[0077] The present invention further identifies molecules (e.g., antibodies) that specifically bind to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibit tumor growth *in vivo*. The ligand binding region of Notch, which is necessary and sufficient for ligand binding, has been

identified as EGF repeats 11 and 12, suggesting this region of the Notch receptor is important in Notch signaling and tumorigenesis (Rebay et al., 1991, *Cell* 67:687; Lei et al., 2003, *Dev.* 130:6411; Hambleton et al., 2004, *Structure* 12:2173). Unexpectedly, antibodies that bind outside the ligand binding domain of the extracellular domain of human Notch receptor have been found to inhibit tumor cell growth *in vivo* (see U.S. Patent Publication No. 2008/0131434, incorporated by reference herein in its entirety). Thus, antibodies that bind outside the ligand binding domain of the extracellular domain of one or more of the human Notch receptors—Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4—have value as potential cancer therapeutics.

[0078] An antibody that specifically binds to an epitope containing residues within EGF repeat 10 of human Notch2 has now been identified (Examples 1 and 3 and Figures 3A-3C). The antibody, 59R1, inhibits binding of ligand to Notch2 (Example 1 and Figures 1A-1D) and inhibits ligand-induced Notch2 signaling (Example 4 and Figure 4A-4C), despite binding to Notch2 in a region outside of the ligand-binding region. 59R1 also specifically binds human Notch3 (Example 2 and Figure 2). The antibody has been found to prevent or inhibit tumor cell growth *in vivo* in a variety of different xenograft models, either alone or in combination with a second anti-cancer agent (Examples 5, 6, 7, and 9 and Figures 5A-F, 6, 8-10, and 11A-H). The antibody has also been shown to reduce the tumorigenicity of a tumor *in vivo* in multiple xenograft models by reducing the frequency of cancer stem cells (Examples 8 and 23 and Figures 7 and 19A-C). In addition, treatment with 59R1 was found to downregulate expression of RGS5 (a marker for pericytes and/or vascular smooth muscle cells), Notch3, and HeyL in the stroma of various tumors (Example 10 and Figures 12A-E) and to upregulate hypoxia in breast and colon tumors (Example 11). Without being bound by theory, these data indicate that the 59R1 antibody has an inhibitory effect on tumor angiogenesis that is due, at least in part, to modulation of the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells. Treatment with 59R1 was also found to regulate additional genes in breast tumors. Cell cycle gene pathways, myc-activating genes and several stem cell gene sets were found to be down-regulated by 59R1 (Example 22).

[0079] An additional human antibody, 59R5, has also been developed. 59R5 has properties that are similar to 59R1, such as similar binding affinity to Notch2 and Notch3 and similarities or overlap in their epitopes (Example 13 and Figure 15B). Antibody 59R5 has been shown to have similar activity as 59R1 in blocking Notch2 and Notch 3 signaling (Example 13 and Figure 15A). The 59R5 antibody has also been shown to inhibit tumor growth *in vivo* in several xenograft models, either alone or in combination with a second anti-cancer agent (Examples 14 and 15 and Figures 16A-C and 17A-B). In addition, treatment with 59R5, like 59R1, was found to downregulate expression of RGS5, Notch3, and HeyL in the stroma of various tumors, and 59R5 was also found to regulate the expression of human genes ID4, EDNRA, and EGLN3 in tumor cells to a similar extent as 59R1 (Example 16). 59R5 was further shown

to reduce the tumorigenicity in vivo in a xenograft model by reducing the frequency of cancer stem cells (Example 23 and 19D).

Definitions

[0080] An "antagonist" of a Notch receptor is a term that includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of the Notch pathway. Suitable antagonist molecules specifically include antagonist antibodies or antibody fragments.

[0081] The term "antibody" is used to mean an immunoglobulin molecule that recognizes and specifically binds to a target, such as a protein, polypeptide, peptide, carbohydrate, polynucleotide, lipid, or combinations of the foregoing etc., through at least one antigen recognition site within the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term encompasses intact polyclonal antibodies, intact monoclonal antibodies, antibody fragments (such as Fab, Fab', F(ab')2, and Fv fragments), single chain Fv (scFv) mutants, multispecific antibodies such as bispecific antibodies generated from at least two intact antibodies, fusion proteins comprising an antibody portion, and any other modified immunoglobulin molecule comprising an antigen recognition site so long as the antibodies exhibit the desired biological activity. An antibody can be of any the five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, or subclasses (isotypes) thereof (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2), based on the identity of their heavy-chain constant domains referred to as alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The different classes of immunoglobulins have different and well known subunit structures and three-dimensional configurations. Antibodies can be naked or conjugated to other molecules such as toxins, radioisotopes, etc.

[0082] As used herein, the term "antibody fragment" refers to a portion of an intact antibody and refers to the antigenic determining variable regions of an intact antibody. Examples of antibody fragments include, but are not limited to Fab, Fab', F(ab')2, and Fv fragments, linear antibodies, single chain antibodies, and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

[0083] An "Fv antibody" refers to the minimal antibody fragment that contains a complete antigen-recognition and -binding site either as two-chains, in which one heavy and one light chain variable domain form a non-covalent dimer, or as a single-chain (scFv), in which one heavy and one light chain variable domain are covalently linked by a flexible peptide linker so that the two chains associate in a similar dimeric structure. In this configuration the complementary determining regions (CDRs) of each variable domain interact to define the antigen-binding specificity of the Fv dimer. Alternatively a single variable domain (or half of an Fv) can be used to recognize and bind antigen, although generally with lower affinity.

[0084] A "monoclonal antibody" as used herein refers to homogenous antibody population involved in the highly specific recognition and binding of a single antigenic determinant, or epitope. This is in

contrast to polyclonal antibodies that typically include different antibodies directed against different antigenic determinants. The term "monoclonal antibody" encompasses both intact and full-length monoclonal antibodies as well as antibody fragments (such as Fab, Fab', F(ab')2, Fv), single chain (scFv) mutants, fusion proteins comprising an antibody portion, and any other modified immunoglobulin molecule comprising an antigen recognition site. Furthermore, "monoclonal antibody" refers to such antibodies made in any number of manners including, but not limited to, by hybridoma, phage selection, recombinant expression, and transgenic animals.

[0085] As used herein, the term "humanized antibody" refers to forms of non-human (e.g., murine) antibodies that are specific immunoglobulin chains, chimeric immunoglobulins, or fragments thereof that contain minimal non-human sequences. Typically, humanized antibodies are human immunoglobulins in which residues from the complementary determining region (CDR) are replaced by residues from the CDR of a non-human species (e.g. mouse, rat, rabbit, hamster, etc.) that have the desired specificity, affinity, and capability. In some instances, the Fv framework region (FR) residues of a human immunoglobulin are replaced with the corresponding residues in an antibody from a non-human species that has the desired specificity, affinity, and capability. The humanized antibody can be further modified by the substitution of additional residue either in the Fv framework region and/or within the replaced non-human residues to refine and optimize antibody specificity, affinity, and/or capability. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two or three, variable domains containing all or substantially all of the CDR regions that correspond to the non-human immunoglobulin whereas all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody can also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Examples of methods used to generate humanized antibodies are described in U.S. Pat. No. 5,225,539, herein incorporated by reference.

[0086] A "variable region" of an antibody refers to the variable region of the antibody light chain or the variable region of the antibody heavy chain, either alone or in combination. The variable regions of the heavy and light chain each consist of four framework regions (FR) connected by three complementarity determining regions (CDRs) also known as hypervariable regions. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies. There are at least two techniques for determining CDRs: (1) an approach based on cross-species sequence variability (i.e., Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); and (2) an approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes (Al-lazikani et al 1997, *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). In addition, combinations of these two approaches are sometimes used in the art to determine CDRs.

[0087] The term "human antibody" as used herein means an antibody produced by a human or an antibody having an amino acid sequence corresponding to an antibody produced by a human made using any of the techniques known in the art. This definition of a human antibody includes intact or full-length antibodies, fragments thereof, and/or antibodies comprising at least one human heavy and/or light chain polypeptide such as, for example, an antibody comprising murine light chain and human heavy chain polypeptides.

[0088] "Hybrid antibodies" are immunoglobulin molecules in which pairs of heavy and light chains from antibodies with different antigenic determinant regions are assembled together so that two different epitopes or two different antigens can be recognized and bound by the resulting tetramer.

[0089] The term "chimeric antibodies" refers to antibodies wherein the amino acid sequence of the immunoglobulin molecule is derived from two or more species. Typically, the variable region of both light and heavy chains corresponds to the variable region of antibodies derived from one species of mammals (e.g. mouse, rat, rabbit, etc.) with the desired specificity, affinity, and capability while the constant regions are homologous to the sequences in antibodies derived from another (usually human) to avoid eliciting an immune response in that species.

[0090] The term "epitope" or "antigenic determinant" are used interchangeably herein and refer to that portion of an antigen capable of being recognized and specifically bound by a particular antibody. When the antigen is a polypeptide, epitopes can be formed both from contiguous amino acids and noncontiguous amino acids juxtaposed by tertiary folding of a protein. Epitopes formed from contiguous amino acids are typically retained upon protein denaturing, whereas epitopes formed by tertiary folding are typically lost upon protein denaturing. An epitope typically includes at least 3, and more usually, at least 5 or 8-10 amino acids in a unique spatial conformation.

[0091] Competition between antibodies is determined by an assay in which the immunoglobulin under study inhibits specific binding of a reference antibody to a common antigen. Numerous types of competitive binding assays are known, for example: solid phase direct or indirect radioimmunoassay (RIA), solid phase direct or indirect enzyme immunoassay (EIA), sandwich competition assay (see Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); solid phase direct biotin-avidin EIA (see Kirkland et al., *J. Immunol.* 1986, 137:3614-3619); solid phase direct labeled assay, solid phase direct labeled sandwich assay (see Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); solid phase direct label RIA using I-125 label (see Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25(1):7-15); solid phase direct biotin-avidin EIA (Cheung et al., 1990, *Virology* 176:546-552); and direct labeled RIA (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Typically, such an assay involves the use of purified antigen bound to a solid surface or cells bearing either of these, an unlabeled test immunoglobulin and a labeled reference immunoglobulin. Competitive inhibition is measured by determining the amount of label bound to the solid surface or cells in the presence of the test immunoglobulin. Usually the test

immunoglobulin is present in excess. Antibodies identified by competition assay (competing antibodies) include antibodies binding to the same epitope as the reference antibody and antibodies binding to an adjacent epitope sufficiently proximal to the epitope bound by the reference antibody for steric hindrance to occur. Usually, when a competing antibody is present in excess, it will inhibit specific binding of a reference antibody to a common antigen by at least 50 or 75%.

[0092] That an antibody "selectively binds" or "specifically binds" to an epitope or receptor means that the antibody reacts or associates more frequently, more rapidly, with greater duration, with greater affinity, or with some combination of the above to the epitope or receptor than with alternative substances, including unrelated proteins. "Selectively binds" or "specifically binds" means, for instance, that an antibody binds to a protein with a K_D of about 0.1 mM or less, more usually about 1 μM or less. "Selectively binds" or "specifically binds" means at times that an antibody binds to a protein with a K_D of about 0.1 mM or less, at times about 1 μM or less, at times about 0.1 μM or less, at times about 0.01 μM or less, and at times about 1 nM or less. Because of the sequence identity between homologous proteins in different species, specific binding can include an antibody that recognizes a Notch receptor in more than one species. Likewise, because of homology between different Notch receptors (e.g., Notch2 and Notch3) in certain regions of the polypeptide sequences of the receptors, specific binding can include an antibody that recognizes more than one Notch receptor. It is understood that, in certain embodiments, an antibody or binding moiety that specifically binds to a first target may or may not specifically bind to a second target. As such, "specific binding" does not necessarily require (although it can include) exclusive binding, i.e. binding to a single target. Thus, an antibody may, in certain embodiments, specifically bind to more than one target (e.g., human Notch2 and Notch3). In certain embodiments, the multiple targets may be bound by the same antigen-binding site on the antibody. For example, an antibody may, in certain instances, comprise two identical antigen-binding sites, each of which specifically binds two or more human Notch receptors (e.g., human Notch2 and Notch3). In certain alternative embodiments, an antibody may be bispecific and comprise at least two antigen-binding sites with differing specificities. By way of non-limiting example, a bispecific antibody may comprise one antigen-binding site that recognizes an epitope on one Notch receptor, such as human Notch2, and further comprises a second, different antigen-binding site that recognizes a different epitope on a second Notch receptor, such as human Notch3. Generally, but not necessarily, reference to "binding" herein means "specific binding."

[0093] As used herein, the terms "non-specific binding" and "background binding" when used in reference to the interaction of an antibody and a protein or peptide refer to an interaction that is not dependent on the presence of a particular structure (i.e., the antibody is binding to proteins in general rather that a particular structure such as an epitope).

[0094] The terms "isolated" or "purified" refer to material that is substantially or essentially free from components that normally accompany it in its native state. Purity and homogeneity are typically

determined using analytical chemistry techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis or high performance liquid chromatography. A protein (e.g. an antibody) or nucleic acid that is the predominant species present in a preparation is substantially purified. In particular, an isolated nucleic acid is separated from open reading frames that naturally flank the gene and encode proteins other than protein encoded by the gene. An isolated antibody is separated from other non-immunoglobulin proteins and from other immunoglobulin proteins with different antigen binding specificity. It can also mean that the nucleic acid or protein is at least 85% pure, at least 95% pure, and in some embodiments, at least 99% pure.

[0095] As used herein, the terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals in which a population of cells are characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer.

[0096] The terms "proliferative disorder" and "proliferative disease" refer to disorders associated with abnormal cell proliferation such as cancer.

[0097] "Tumor" and "neoplasm" as used herein refer to any mass of tissue that result from excessive cell growth or proliferation, either benign (noncancerous) or malignant (cancerous) including pre-cancerous lesions.

[0098] "Metastasis" as used herein refers to the process by which a cancer spreads or transfers from the site of origin to other regions of the body with the development of a similar cancerous lesion at the new location. A "metastatic" or "metastasizing" cell is one that loses adhesive contacts with neighboring cells and migrates via the bloodstream or lymph from the primary site of disease to invade neighboring body structures.

[0099] As used herein, the term "subject" refers to any animal (e.g., a mammal), including, but not limited to humans, non-human primates, rodents, and the like, which is to be the recipient of a particular treatment. Typically, the terms "subject" and "patient" are used interchangeably herein in reference to a human subject.

[00100] The terms "cancer stem cell" or "tumor stem cell" or "solid tumor stem cell" are used interchangeably herein and refer to a population of cells from a solid tumor that: (1) have extensive proliferative capacity; 2) are capable of asymmetric cell division to generate one or more kinds of differentiated progeny with reduced proliferative or developmental potential; and (3) are capable of symmetric cell divisions for self-renewal or self-maintenance. These properties of "cancer stem cells" or

"tumor stem cells" or "solid tumor stem cells" confer on those cancer stem cells the ability to form palpable tumors upon serial transplantation into an immunocompromised mouse compared to the majority of tumor cells that fail to form tumors. Cancer stem cells undergo self-renewal versus differentiation in a chaotic manner to form tumors with abnormal cell types that can change over time as mutations occur.

[00101] The terms "cancer cell" or "tumor cell" and grammatical equivalents refer to the total population of cells derived from a tumor including both non-tumorigenic cells, which comprise the bulk of the tumor cell population, and tumorigenic stem cells (cancer stem cells).

[00102] As used herein "tumorigenic" refers to the functional features of a solid tumor stem cell including the properties of self-renewal (giving rise to additional tumorigenic cancer stem cells) and proliferation to generate all other tumor cells (giving rise to differentiated and thus non-tumorigenic tumor cells) that allow solid tumor stem cells to form a tumor.

[00103] As used herein, the "tumorigenicity" of a tumor refers to the ability of a random sample of cells from the tumor to form palpable tumors upon serial transplantation into immunocompromised mice.

[00104] As used herein, the terms "stem cell cancer marker" or "cancer stem cell marker" or "tumor stem cell marker" or "solid tumor stem cell marker" refer to a gene or genes or a protein, polypeptide, or peptide expressed by the gene or genes whose expression level, alone or in combination with other genes, is correlated with the presence of tumorigenic cancer cells compared to non-tumorigenic cells. The correlation can relate to either an increased or decreased expression of the gene (e.g., increased or decreased levels of mRNA or the peptide encoded by the gene).

[00105] The terms "cancer stem cell gene signature" or "tumor stem cell gene signature" or "cancer stem cell signature" are used interchangeably herein to refer to gene signatures comprising genes differentially expressed in cancer stem cells compared to other cells or population of cells, for example normal breast epithelial tissue. In some embodiments the cancer stem cell gene signatures comprise genes differentially expressed in cancer stem cells versus normal breast epithelium by a fold change, for example by 2 fold reduced and/or elevated expression, and further limited by using a statistical analysis such as, for example, by the P value of a t-test across multiple samples. In another embodiment, the genes differentially expressed in cancer stem cells are divided into cancer stem cell gene signatures based on the correlation of their expression with a chosen gene in combination with their fold or percentage expression change. Cancer stem cell signatures are predictive both retrospectively and prospectively of an aspect of clinical variability, including but not limited to metastasis and death.

[00106] The term "genetic test" as used herein refers to procedures whereby the genetic make-up of a patient or a patient tumor sample is analyzed. The analysis can include detection of DNA, RNA, chromosomes, proteins or metabolites to detect heritable or somatic disease-related genotypes or karyotypes for clinical purposes.

[00107] As used herein, the terms "biopsy" or "biopsy tissue" refer to a sample of tissue or fluid that is removed from a subject for the purpose of determining if the sample contains cancerous tissue. In some embodiments, biopsy tissue or fluid is obtained because a subject is suspected of having cancer. The biopsy tissue or fluid is then examined for the presence or absence of cancer.

[00108] As used herein an "acceptable pharmaceutical carrier" refers to any material that, when combined with an active ingredient of a pharmaceutical composition such as an antibody, allows the antibody, for example, to retain its biological activity. In addition, an "acceptable pharmaceutical carrier" does not trigger an immune response in a recipient subject. Examples include, but are not limited to, any of the standard pharmaceutical carriers such as a phosphate buffered saline solution, water, and various oil/water emulsions. Some diluents for aerosol or parenteral administration are phosphate buffered saline or normal (0.9%) saline.

[00109] The term "therapeutically effective amount" refers to an amount of an antibody, polypeptide, polynucleotide, small organic molecule, or other drug effective to "treat" a disease or disorder in a subject or mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of the drug can reduce the number of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit or stop cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit and stop tumor metastasis; inhibit and stop tumor growth; relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer, or a combination of such effects on cancer cells. To the extent the drug prevents growth and/or kills existing cancer cells, it can be referred to as cytostatic and/or cytotoxic.

[00110] Terms such as "treating" or "treatment" or "to treat" or "alleviating" or "to alleviate" refer to both 1) therapeutic measures that cure, slow down, lessen symptoms of, and/or halt progression of a diagnosed pathologic condition or disorder and 2) prophylactic or preventative measures that prevent or slow the development of a targeted pathologic condition or disorder. Thus those in need of treatment include those already with the disorder; those prone to have the disorder; and those in whom the disorder is to be prevented. In some embodiments, a subject is successfully "treated" for cancer according to the methods of the present invention if the patient shows one or more of the following: a reduction in the number of or complete absence of cancer cells; a reduction in the tumor size; inhibition of or an absence of cancer cell infiltration into peripheral organs including the spread of cancer into soft tissue and bone; inhibition of or an absence of tumor metastasis; inhibition or an absence of tumor growth; relief of one or more symptoms associated with the specific cancer; reduced morbidity and mortality; and improvement in quality of life. Thus, in certain embodiments, treatment of cancer comprises inhibition of tumor growth in a subject.

[00111] As used herein, the terms "polynucleotide" or "nucleic acid" refer to a polymer composed of a multiplicity of nucleotide units (ribonucleotide or deoxyribonucleotide or related structural variants) linked via phosphodiester bonds, including but not limited to, DNA or RNA. The term encompasses sequences that include any of the known base analogs of DNA and RNA including, but not limited to, 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N6-methyladenosine, aziridinylcytosine, pseudoisocytosine,

5-(carboxyhydroxylmethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl 2-thiouracil, 5- carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N6-isopentenyladenine, 1- methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl 2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonylmethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2 thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, and 2,6-diaminopurine.

[00112] The term "gene" refers to a nucleic acid (e.g., DNA) sequence that comprises coding sequences necessary for the production of a polypeptide, precursor, or RNA (e.g., rRNA, tRNA). The polypeptide can be encoded by a full length coding sequence or by any portion of the coding sequence so long as the desired activity or functional properties (e.g., enzymatic activity, ligand binding, signal transduction, immunogenicity, etc.) of the full-length polypeptide or fragment are retained. The term also encompasses the coding region of a structural gene and the sequences located adjacent to the coding region on both the 5' and 3' ends for a distance of about 1 kb or more on either end such that the gene corresponds to the length of the full-length mRNA. Sequences located 5' of the coding region and present on the mRNA are referred to as 5' non-translated sequences. Sequences located 3' or downstream of the coding region and present on the mRNA are referred to as 3' non-translated sequences. The term "gene" encompasses both cDNA and genomic forms of a gene. A genomic form or clone of a gene contains the coding region interrupted with non-coding sequences termed "introns" or "intervening regions" or "intervening sequences". Introns are segments of a gene that are transcribed into nuclear RNA (hnRNA); introns can contain regulatory elements such as enhancers. Introns are removed or "spliced out" from the nuclear or primary transcript; introns therefore are absent in the messenger RNA (mRNA) transcript. The mRNA functions during translation to specify the sequence or order of amino acids in a nascent polypeptide. In addition to containing introns, genomic forms of a gene can also include sequences located on both the 5' and 3' end of the sequences that are present on the RNA transcript. These sequences are referred to as "flanking" sequences or regions (these flanking sequences are located 5' or 3' to the non-translated sequences present on the mRNA transcript). The 5' flanking region can contain regulatory sequences such as promoters and enhancers that control or influence the transcription of the gene. The 3' flanking region can contain sequences that direct the termination of transcription, post transcriptional cleavage, and polyadenylation.

[00113] The term "recombinant" when used with reference to a cell, nucleic acid, protein or vector indicates that the cell, nucleic acid, protein or vector has been modified by the introduction of a heterologous nucleic acid or protein, the alteration of a native nucleic acid or protein, or that the cell is

derived from a cell so modified. Thus, e.g., recombinant cells express genes that are not found within the native (non-recombinant) form of the cell or express native genes that are overexpressed or otherwise abnormally expressed such as, for example, expressed as non-naturally occurring fragments or splice variants. By the term "recombinant nucleic acid" herein is meant nucleic acid, originally formed *in vitro*, in general, by the manipulation of nucleic acid, e.g., using polymerases and endonucleases, in a form not normally found in nature. In this manner, operably linkage of different sequences is achieved. Thus an isolated nucleic acid, in a linear form, or an expression vector formed *in vitro* by ligating DNA molecules that are not normally joined, are both considered recombinant for the purposes of this invention. It is understood that once a recombinant nucleic acid is made and introduced into a host cell or organism, it will replicate non-recombinantly, i.e., using the *in vivo* cellular machinery of the host cell rather than *in vitro* manipulations; however, such nucleic acids, once produced recombinantly, although subsequently replicated non-recombinantly, are still considered recombinant for the purposes of the invention. Similarly, a "recombinant protein" is a protein made using recombinant techniques, i.e., through the expression of a recombinant nucleic acid as depicted above.

[00114] As used herein, the term "vector" is used in reference to nucleic acid molecules that transfer DNA segment(s) from one cell to another. The term "vehicle" is sometimes used interchangeably with "vector." Vectors are often derived from plasmids, bacteriophages, or plant or animal viruses.

[00115] As used herein, the term "gene expression" refers to the process of converting genetic information encoded in a gene into RNA (e.g., mRNA, rRNA, tRNA, or snRNA) through "transcription" of the gene (e.g., via the enzymatic action of an RNA polymerase), and for protein encoding genes, into protein through "translation" of mRNA. Gene expression can be regulated at many stages in the process. "Up-regulation" or "activation" refers to regulation that increases the production of gene expression products (e.g., RNA or protein), while "down-regulation" or "repression" refers to regulation that decrease production. Molecules (e.g., transcription factors) that are involved in up-regulation or down-regulation are often called "activators" and "repressors", respectively.

[00116] The terms "polypeptide" or "peptide" or "protein" or "protein fragment" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-naturally occurring amino acid polymers.

[00117] The term "amino acid" refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function similarly to the naturally occurring amino acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the genetic code, as well as those amino acids that are later modified, e.g., hydroxyproline, gamma-carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Amino acid analogs refers to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino

acid, e.g., an alpha carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group, e.g., homoserine, norleucine, methionine sulfoxide, methionine methyl sulfonium. Such analogs can have modified R groups (e.g., norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid. Amino acid mimetics refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but that functions similarly to a naturally occurring amino acid.

[00118] "Conservatively modified variants" applies to both amino acid and nucleic acid sequences. "Amino acid variants" refers to amino acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical or associated (e.g., naturally contiguous) sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode most proteins. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to another of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein which encodes a polypeptide also describes silent variations of the nucleic acid. It is recognized that in certain contexts each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, silent variations of a nucleic acid which encodes a polypeptide is implicit in a described sequence with respect to the expression product, but not with respect to actual probe sequences. As to amino acid sequences, it will be recognized that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid, peptide, polypeptide, or protein sequence which alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded sequence is a "conservatively modified variant" including where the alteration results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention. Tables providing functionally similar amino acids useful for conservative amino acid substitutions are well known in the art. Typical conservative substitutions include: 1) Alanine (A), Glycine (G); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W); 7) Serine (S), Threonine (T); and 8) Cysteine (C), Methionine (M) (see, e.g., Creighton, Proteins (1984)). (See, also, Table 1 herein).

[00119] As used in the present disclosure and claims, the singular forms "a", "an" and "the" include plural forms unless the context clearly dictates otherwise.

[00120] It is understood that wherever embodiments are described herein with the language "comprising," otherwise analogous embodiments described in terms of "consisting of" and/or "consisting essentially of" are also provided.

Certain Embodiments of the Present Invention

[00121] The present invention provides compositions and methods for studying, diagnosing, characterizing, and treating cancer. In particular, in certain embodiments, the present invention provides agents, including antagonists, that bind Notch receptors and methods of using the agents or antagonists to inhibit tumor growth and treat cancer or other disease in human patients. In certain embodiments, the antagonists are antibodies that specifically recognize one or more human Notch receptors.

[00122] In one aspect, the present invention provides an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor. In some embodiments, the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor inhibits growth of tumors. In certain embodiments, the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth, specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of at least two Notch receptor family members. In certain embodiments, the antibody binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of Notch2 and/or Notch3 receptor. In some embodiments, the antibody binds to a non-ligand binding region of the human Notch2. In some embodiments, the antibody binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of Notch2 and Notch3. In some embodiments, the antibody binds to a non-ligand binding region of the human Notch3. In some embodiments, the antibody binds to Notch1 and/or Notch4.

[00123] In certain embodiments, the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth is a monoclonal antibody. In certain embodiments, the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits growth of tumors is a chimeric antibody. In certain embodiments, the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits growth of tumors is a humanized antibody. In certain embodiments, the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth is a human antibody. In certain embodiments, the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth is a monospecific antibody. In certain embodiments, the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth is a bispecific antibody. In certain embodiments, the present invention provides a hybridoma producing an antibody that specifically

binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth.

[00124] In certain embodiments the present invention provides an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region comprising EGF repeats 1-10 of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. In certain embodiments the present invention provides an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region comprising EGF repeat 10 (or equivalent) of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. In certain embodiments the present invention provides an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region comprising EGF repeats 13-36 of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. Certain embodiments provide an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region comprising EGF repeats 4 of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. Certain embodiments provide an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region comprising EGF repeat 13 of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the antibody specifically binds to a non-ligand binding region comprising the LNR-HD domain and inhibits tumor growth.

[00125] In certain embodiments the present invention provides a method of treating cancer in a subject in need thereof comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor protein and inhibits tumor growth in the subject. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to at least two Notch receptor family members and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer in a subject in need thereof comprises administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of Notch2 and/or Notch3 receptor and inhibits tumor growth.

[00126] In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of a monoclonal antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of a chimeric antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of a humanized antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of a human antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. In some

embodiments, the antibody is a monospecific antibody. In some embodiments, the antibody is a bispecific antibody.

[00127] In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor comprising EGF repeats 1-10 and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor comprising EGF repeat 10 (or the equivalent if Notch3) and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor comprising EGF repeats 13-36 and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor comprising EGF repeat 4 and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor comprising EGF repeat 4 and inhibits tumor growth. In certain other embodiments, the antibody that is administered specifically binds to the LNR-HD domain of a human Notch receptor.

[00128] In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody conjugated to a cytotoxic moiety that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth in combination with radiation therapy. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth in combination with chemotherapy. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth that are from a breast tumor, colorectal tumor, lung tumor, pancreatic tumor, prostate tumor, or a head and neck tumor.

[00129] In certain embodiments, the method of treating cancer comprises identifying patients for treatment with the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor using a genetic test; and administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human

Notch receptor and inhibits tumor growth. In certain embodiments, the method of treating cancer comprises identifying patients for treatment with the antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor using a genetic test that detects a cancer stem cell signature; and administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth.

[00130] In certain embodiments, the present invention provides a method of identifying a molecule that binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth, the method comprising: i) incubating the molecule with the non-ligand binding domain of the extracellular domain of a human Notch receptor; ii) determining if the molecule binds to the non-ligand binding region of the extracellular domain of the human Notch receptor; and iii) determining if the molecule inhibits tumor growth. In certain embodiments, the invention provides a method of identifying a molecule that binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth, the method comprising: i) incubating the molecule with the non-ligand binding domain of the extracellular domain of a human Notch receptor comprising EGF repeats 1-10; ii) determining if the molecule binds to the non-ligand binding region of the extracellular domain of the human Notch receptor comprising EGF repeats 1-10; and iii) determining if the molecule inhibits tumor growth. In certain embodiments, the invention provides a method of identifying a molecule that binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth, the method comprising: i) incubating the molecule with the non-ligand binding domain of the extracellular domain of a human Notch receptor comprising EGF repeat 10 (or equivalent if Notch3); ii) determining if the molecule binds to the non-ligand binding region of the extracellular domain of the human Notch receptor comprising EGF repeat 10 (or equivalent if Notch3); and iii) determining if the molecule inhibits tumor growth. In certain embodiments, the invention provides a method of identifying a molecule that binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth, the method comprising: i) incubating the molecule with the non-ligand binding domain of the extracellular domain of a human Notch receptor comprising EGF repeats 13-36; ii) determining if the molecule binds to the non-ligand binding region of the extracellular domain of the human Notch receptor comprising EGF repeats 13-36; and iii) determining if the molecule inhibits tumor growth.

[00131] In certain embodiments, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth.

[00132] In certain embodiments, the present invention provides a method of making an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth.

[00133] In certain embodiments, the present invention provides an isolated nucleic acid that encodes an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth.

[00134] In some embodiments, the invention provides an agent (e.g., an antibody) that specifically binds to an EGF10 domain (or an equivalent of an EGF10 domain if Notch3) of one or more human Notch receptors. In certain embodiments, the agent is an antibody. In certain embodiments, the agent is an antagonist. In certain embodiments, the agent specifically binds to EGF10 of human Notch2 and/or EGF9 of human Notch3. EGF9 is the EGF within human Notch3 that is equivalent to EGF10 in the other human Notch receptors Notch1, Notch2, and Notch4. In certain embodiments, the agent specifically binds human Notch2. In certain embodiments, the agent specifically binds human Notch2 and Notch3. In certain embodiments, the agent specifically binds human Notch3.

[00135] In one aspect, the invention provides a 59R1 antibody comprising the heavy chain and light chain sequences provided in SEQ ID NOs:16 and 18 (with or without signal sequence), respectively, or as encoded by the DNA deposited with ATCC on October 15, 2008, and assigned designation number PTA-9547. The invention further provides polypeptides or antibodies that comprise the heavy chain variable region (e.g., SEQ ID NO:14) and/or the light chain variable region (e.g., SEQ ID NO:13) of such a 59R1 antibody. The invention further provides polypeptides or antibodies comprising one or more (e.g., 1, 2, or 3) of the heavy chain CDRs, and/or one or more of the light chain CDRs of the 59R1 antibody. In still further embodiments, the invention provides antibodies that bind to the same epitope as the 59R1 antibody or antibodies that compete for specific binding to human Notch2 and/or Notch3 with the 59R1 antibody.

[00136] In another aspect, the invention provides a 59R5 antibody comprising the heavy chain and light chain sequences provided in SEQ ID NOs:49 and 18 (with or without signal sequence), respectively, or as encoded by the DNA deposited with ATCC on July 6, 2009 and assigned designation number [...]. The invention further provides polypeptides or antibodies that comprise the heavy chain variable region and/or the light chain variable region sequences SEQ ID NO:50 and/or SEQ ID NO:13. The invention further provides polypeptides or antibodies comprising one or more (e.g., 1, 2, or 3) of the heavy chain CDRs and/or one or more of the light chain CDRs of the 59R5 antibody. In still further embodiments, the invention provides antibodies that bind to the same epitope as the 59R5 antibody or antibodies that compete for specific binding to human Notch2 and/or Notch3 with the 59R5 antibody.

[00137] In certain additional embodiments, the invention provides an antibody that specifically binds to two or more (i.e., at least two or two, three, or four) human Notch receptors. In certain embodiments, the antibody specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of the two or more

human Notch receptors. In certain embodiments, the antibody is a monospecific antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of the two or more human Notch receptors. In certain embodiments, the antibody binds to EGF10 of Notch1, Notch2, or Notch4, and/or to EGF9 of Notch3. In certain embodiments, the non-ligand binding region to which the antibody binds is not EGF4 or does not comprise EGF4. In certain embodiments, the two or more human Notch receptors comprise Notch2 and/or Notch3. In certain embodiments, the two or more human Notch receptors comprise Notch2 and Notch3. In certain embodiments, the antibody is an antagonist of the two or more human Notch receptors.

[00138] The invention further provides a method of modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells in a subject, wherein the method comprises administering to the subject an effective amount of an agent that specifically binds human Notch2 and/or human Notch3. In certain embodiments, the agent is an antibody. In certain embodiments, the agent is an antagonist.

[00139] The invention further provides a method of inhibiting angiogenesis in a subject, comprising the step of administering to the subject an effective amount of an agent that specifically binds human Notch2 and/or human Notch3. In certain embodiments, the agent is an antibody. In certain embodiments, the agent is an antagonist. In certain embodiments, the antagonist is an antagonist of Notch2. In certain embodiments, the antagonist is an antagonist of Notch3. In certain embodiments, the antagonist is an antagonist of Notch2 and Notch3. In some embodiments, the method of inhibiting angiogenesis comprises modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells. In some embodiments, the angiogenesis is tumor angiogenesis.

[00140] In certain embodiments, the Notch-binding agent is an antagonist of the human Notch receptor(s) to which it specifically binds. In some alternative embodiments, the Notch-binding agent is an agonist of the human Notch receptor(s) to which it specifically binds.

[00141] In certain embodiments, the agent that specifically binds to one or more Notch receptor(s) and is an antagonist of the one or more Notch receptor(s) inhibits at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or about 100% of one or more activities of the bound Notch receptor(s).

[00142] In certain embodiments, the antagonist of one or more human Notch receptor(s) (e.g., Notch2 and/or Notch3) has one or more of the following effects: inhibit ligand binding to the one or more human Notch receptors, inhibit ligand-induced signaling by the one or more Notch receptors; inhibit proliferation of tumor cells; reduce the tumorigenicity of a tumor by reducing the frequency of cancer stem cells in the tumor; inhibit tumor growth; increase survival, trigger cell death of tumor cells; inhibit angiogenesis; or prevent metastasis of tumor cells.

[00143] In certain embodiments, the antagonist has one or more of the following effects: interference with the expression of a Notch receptor; interference with activation of a Notch receptor signal transduction

pathway by, for example, sterically inhibiting interactions between the Notch receptor and one or more of its ligands, or binding to a human Notch receptor and triggering cell death or inhibiting cell proliferation.

[00144] In certain embodiments, antagonists against a Notch receptor, such as Notch2 or Notch3, act extracellularly to act upon or inhibit the function of the Notch receptor. In certain embodiments, an antagonist is a small molecule that binds to the extracellular domain of a Notch receptor. In certain embodiments, an antagonist of a Notch receptor is proteinaceous. In some embodiments, proteinaceous antagonists of a Notch receptor are antibodies that specifically bind to an extracellular epitope of a Notch receptor. Extracellular binding of an antagonist against a Notch receptor can inhibit the signaling of a Notch receptor protein by inhibiting intrinsic activation (e.g., kinase activity) of a Notch receptor and/or by sterically inhibiting the interaction, for example, of a Notch receptor with one of its ligands. Furthermore, extracellular binding of an antagonist against a Notch receptor can down-regulate cell-surface expression of a Notch receptor such as, for example, by internalization of a Notch receptor and/or decreasing cell surface trafficking of a Notch receptor.

[00145] In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist (e.g., antibody) specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of at least one human Notch receptor, wherein the non-ligand binding region comprises EGF repeat 10 (or the equivalent if Notch3). In certain embodiments, the agent or antagonist specifically binds to Notch2. In certain embodiments, the agent or antagonist specifically binds to Notch3. In certain embodiments, the agent or antagonist specifically binds to both human Notch2 and human Notch3.

[00146] In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist (e.g., antibody) specifically binds to an EGF10 domain of human Notch2. In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist does not bind to any region of the human Notch2 outside of the EGF10 domain. In certain alternative embodiments, the Notch-binding agent or antagonist that specifically binds to an EGF10 domain of human Notch2, also further binds to another region of human Notch2. In other words, in some embodiments, the entire epitope of the agent or antagonist falls within EGF10. In certain other embodiments, the epitope of the agent or antagonist that binds to human Notch2 partially overlaps with EGF10. In certain embodiments, the agent or antagonist binds to at least part of the sequence HKGAL (SEQ ID NO:28) within human Notch2 EGF10. In certain embodiments, the agent or antagonist also binds to other amino acids within human Notch2 EGF10 (e.g., the entire epitope of an anti-Notch2 antibody is not necessarily contained entirely within the sequence HKGAL). In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist further specifically binds to at least one additional human Notch receptor (e.g., Notch1, Notch3, or Notch4). In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist that binds to EGF10 of human Notch2 further binds to an EGF10 domain of human Notch1, an EGF9 domain of human Notch3, and/or an EGF10 domain of human Notch4. In certain embodiments, the additional human Notch receptor is human Notch3.

[00147] In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist (e.g., antibody) binds to an EGF9 domain of human Notch3. As is apparent from the homology between the sequences of the extracellular domains of human Notch2 and human Notch3, EGF9 is the EGF that is the functional/structural equivalent of Notch2 EGF10 in human Notch3. In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist does not bind to any region of the human Notch3 outside of EGF9. In certain embodiments, the agent or antagonist binds to at least part of the sequence HEDAI (SEQ ID NO:29) within the human Notch3 EGF9 domain. HEDAI (SEQ ID NO:29) is the sequence within the Notch3 EGF9 domain that corresponds to sequence HKGAL (SEQ ID NO:28) within human Notch2 EGF10. In certain embodiments, the agent or antagonist also binds to other amino acids within human Notch3 EGF9. In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist binds to an EGF10 domain of at least one additional human Notch receptor (e.g., Notch1, Notch2, and/or Notch4). In certain embodiments, the additional human Notch receptor is human Notch2, such as an agent or antagonist that binds to an EGF10 domain of human Notch2. In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist does not bind to any region of the human Notch2 outside of EGF10. In certain embodiments, the agent or antagonist binds to at least part of the sequence HKGAL (SEQ ID NO:28) within human Notch2 EGF10. In some embodiments, the agent or antagonist is a monospecific antibody that binds to at least part of the sequence HKGAL (SEQ ID NO:28) in Notch2 and also binds to at least part of the sequence HEDAI (SEQ ID NO:29) in Notch3.

[00148] In certain alternative embodiments, the Notch-binding agent or antagonist binds to a portion of the non-ligand binding region of an extracellular domain of a Notch1, Notch2, or Notch4 receptor in a region other than EGF10 or a Notch3 receptor in a region other than EGF9. For example, in certain embodiments, the agent or antagonist binds to the LNR-HD domain of one or more Notch receptors. In certain embodiments, the agent or antagonist binds to EGF1, EGF2, EGF3, EGF4, EGF5, EGF6, EGF7, EGF9, EGF10, EGF13, EGF14, EGF15, EGF16, EGF17, EGF18, EGF19, EGF20, EGF21, EGF22, EGF23, EGF24, EGF25, EGF26, EGF27, EGF28, EGF29, EGF30, EGF31, EGF32, EGF33, EGF34, EGF35, and/or EGF36 of an extracellular domain of one or more Notch receptors.

[00149] In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist binds to the ligand binding region of an extracellular domain of one or more human Notch receptors. Thus, in certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist may bind to EGF11 and/or EGF12 of Notch 1, 2, or 4 (Rebay et al., 1991, *Cell* 67:687; Lei et al., 2003, *Dev.* 130:6411; Hambleton et al., 2004, *Structure* 12:2173) or EGF10 and/or EGF11 of Notch3 (Peters et al., 2004, *Experimental Cell Research*, 299:454-464).

[00150] In certain embodiments, the Notch-binding agent (e.g., antibody) specifically binds to two or more human Notch receptors (e.g., Notch1, Notch2, Notch3, and/or Notch4). In other words, in certain embodiments, the agent or antibody binds at least two human Notch receptors (i.e., two, three, or four human Notch receptors). Encompassed are agents and antibodies that specifically bind to two human

Notch family receptors (e.g., Notch2 and Notch3, Notch1 and Notch2, Notch1 and Notch3, Notch1 and Notch4, Notch2 and Notch4, or Notch3 and Notch4). Agents and antibodies that specifically bind to three human Notch receptor family members are also envisioned (e.g., agents and antibodies that specifically bind to Notch1, Notch2, and Notch3, Notch1, Notch2, and Notch4, or Notch2, Notch3, and Notch4), as are agents and antibodies that specifically bind to four human Notch receptor family members (e.g., agents and antibodies that specifically bind to Notch1, Notch2, Notch3 and Notch4). In certain embodiments, the agent or antibody specifically binds to both human Notch2 and Notch3. In certain alternative embodiments, the agent or antibody specifically binds to both human Notch1 and Notch2. In some embodiments, the agent or antibody specifically binds to both human Notch1 and Notch3. In still further embodiments, the agent or antibody specifically binds to both human Notch1 and Notch4. In certain embodiments, the agent or antibody is an antagonist of the two or more human Notch receptors.

[00151] In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist binds to a Notch receptor (e.g., Notch2 and/or Notch3) with a dissociation constant of about 1 μM or less, about 100 nM or less, about 40 nM or less, about 20 nM or less, or about 10 nM or less. In certain embodiments, the agent or antagonist binds one or more human Notch receptors, such as human Notch2 and/or human Notch3, with a K_D of 1 nM or less. In some embodiments, the Notch binding agent is an antibody that binds to Notch2 with a K_D of about 1 nM or less. In some embodiments, the Notch binding agent is an antibody that binds to Notch3 with a K_D of about 1 nM or less. In certain embodiments, the dissociation constant for the agent or antagonist with respect to a particular Notch receptor is the dissociation constant determined using a Notch-Fc fusion protein comprising the Notch extracellular domain and/or a portion of the extracellular domain comprising EGF10 immobilized on a Biacore chip.

[00152] In certain embodiments, the antagonist specifically binds to human Notch3 and inhibits binding of a ligand (e.g., DLL4, JAG1, and/or JAG2) to human Notch3 and/or inhibits signaling of human Notch3. In certain embodiments, the antagonist specifically binds to human Notch2 and inhibits binding of a ligand (e.g., DLL4, JAG1, and/or JAG2) to human Notch2 and/or inhibits signaling of human Notch2. In certain embodiments, the antagonist inhibits DLL4-induced Notch2 signaling. In certain embodiments, the antagonist inhibits DLL4-induced Notch3 signaling. In certain embodiments, the antagonist inhibits JAG2-induced Notch2 signaling. In certain embodiments, the antagonist inhibits JAG2-induced Notch3 signaling. In certain embodiments, the signaling by Notch2 and/or Notch3 is reduced by at least about 10%, by at least about 25%, by at least about 50%, by at least about 75%, by at least about 90%, or by at least about 95%. In certain embodiments, the binding of one or more ligands to Notch2 and/or Notch3 is reduced by at least about 10%, by at least about 25%, by at least about 50%, by at least about 75%, by at least about 90%, or by at least about 95%.

[00153] In some embodiments, antagonists against a Notch receptor bind to a Notch receptor and have one or more of the following effects: inhibit proliferation of tumor cells, trigger cell death directly in tumor

cells, or prevent metastasis of tumor cells. In certain embodiments, antagonists of a Notch receptor trigger cell death via a conjugated toxin, chemotherapeutic agent, radioisotope, or other such agent. For example, an antibody against a Notch receptor is conjugated to a toxin that is activated in tumor cells expressing the Notch receptor by protein internalization. In other embodiments, antagonists of a Notch receptor mediate cell death of a cell expressing the Notch receptor via antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). ADCC involves cell lysis by effector cells that recognize the Fc portion of an antibody. Many lymphocytes, monocytes, tissue macrophages, granulocytes and eosinophils, for example, have Fc receptors and can mediate cytolysis (Dillman, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1497). In some embodiments, an antagonist of a Notch receptor is an antibody that triggers cell death of cell expressing a Notch receptor by activating complement-dependent cytotoxicity (CDC). CDC involves binding of serum complement to the Fc portion an antibody and subsequent activation of the complement protein cascade, resulting in cell membrane damage and eventual cell death. Biological activity of antibodies is known to be determined, to a large extent, by the constant domains or Fc region of the antibody molecule (Uananue and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Antibodies of different classes and subclasses differ in this respect, as do antibodies of the same subclass but from different species. Of human antibodies, IgM is the most efficient class of antibodies to bind complement, followed by IgG1, IgG3, and IgG2 whereas IgG4 appears quite deficient in activating the complement cascade (Dillman, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1497; Jefferis et al., 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76). According to the present invention, antibodies of those classes having the desired biological activity are prepared.

[00154] The ability of any particular antibody against a Notch receptor to mediate lysis of the target cell by complement activation and/or ADCC can be assayed. The cells of interest are grown and labeled *in vitro*; the antibody is added to the cell culture in combination with either serum complement or immune cells which can be activated by the antigen antibody complexes. Cytolysis of the target cells is detected, for example, by the release of label from the lysed cells. In fact, antibodies can be screened using the patient's own serum as a source of complement and/or immune cells. The antibody that is capable of activating complement or mediating ADCC in the *in vitro* test can then be used therapeutically in that particular patient.

[00155] In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist is an antibody that does not have one or more effector functions. For instance, in some embodiments, the antibody has no antibody-dependent cellular cytoxicity (ADCC) activity and/or no complement-dependent cytoxicity (CDC) activity. In certain embodiments, the antibody does not bind to an Fc receptor and/or complement factors. In certain embodiments, the antibody has no effector function.

[00156] In other embodiments, antagonists of a Notch receptor can trigger cell death indirectly by inhibiting angiogenesis. Angiogenesis is the process by which new blood vessels form from pre-existing

vessels and is a fundamental process required for normal growth, for example, during embryonic development, wound healing, and in response to ovulation. Solid tumor growth larger than 1-2 mm^2 also requires angiogenesis to supply nutrients and oxygen without which tumor cells die. Thus, in certain embodiments, an antagonist of a Notch receptor targets vascular cells that express the Notch receptor including, for example, endothelial cells, smooth muscle cells or components of the extracellular matrix required for vascular assembly. In certain embodiments, an antagonist of a Notch receptor (e.g., Notch2 and/or Notch3) targets pericytes and/or vascular smooth muscle cells. In other embodiments, an antagonist of a Notch receptor inhibits growth factor signaling required by vascular cell recruitment, assembly, maintenance or survival. In certain embodiments, the antagonist modulates the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells.

[00157] In certain embodiments the Notch-binding agents or antagonists (e.g., antibodies), either alone or in combination with a second therapeutic agent, are capable of inhibiting tumor growth. In certain embodiments, the Notch-binding agents or antagonists are capable of inhibiting tumor growth *in vivo* (e.g., in a xenograft mouse model and/or in a human having cancer). In certain embodiments, the Notch-binding agents or antagonists are capable of inhibiting tumor growth by at least about 10%, at least about 25%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90% at a given time point in a xenograft model. In certain embodiments, the Notch-binding agents or antagonists prevent tumor growth. In certain embodiments, the Notch-binding agents or antagonists inhibit tumor recurrence.

[00158] In certain embodiments, the Notch-binding agents are capable of reducing the tumorigenicity of a tumor. In certain embodiments, the agent or antibody is capable of reducing the tumorigenicity of a tumor comprising cancer stem cells in an animal model, such as a mouse xenograft model. In certain embodiments, the number or frequency of cancer stem cells in a tumor is reduced by at least about two-fold, about three-fold, about five-fold, about ten-fold, about 50-fold, about 100-fold, or about 1000-fold (e.g., in a xenograft model). In certain embodiments, the reduction in the frequency of cancer stem cells is determined by limiting dilution assay using an animal model. An example of a limiting dilution assay used to test the efficacy of an anti-Notch antibody is provided in Example 8, below. Additional examples and guidance regarding the use of limiting dilution assays to determine a reduction in the number or frequency of cancer stem cells in a tumor can be found, e.g., in International Publication No. WO 2008/042236, U.S. Patent Application Publication Nos. 2008/0064049, and 2008/0178305, each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

[00159] The present invention provides a variety of polypeptides, including but not limited to, antibodies and fragments of antibodies. In certain embodiments, the polypeptide is isolated. In certain alternative embodiments, the polypeptide is substantially pure.

[00160] In certain embodiments, the polypeptides of the present invention can be recombinant polypeptides, natural polypeptides, or synthetic polypeptides comprising the sequence of SEQ ID NOs:2,

4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, or 57 (with or without the indicated signal sequences), as well as the polypeptides comprising the polypeptides encoded by the polynucleotides of SEQ ID NOs: 1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59, or 60 (with or without the indicated signal sequences).

[00161] The invention provides a polypeptide comprising the heavy chain and/or the light chain of 59R1 provided in SEQ ID NO:16 and/or SEQ ID NO:18, respectively. In certain embodiments, the polypeptide is an antibody. In certain embodiments, the polypeptide specifically binds Notch2 and/or Notch3. In some embodiments, the polypeptide specifically binds Notch2 and Notch3.

[00162] The invention provides a polypeptide comprising the heavy chain and/or the light chain of 59R5 provided in SEQ ID NO:49 and/or SEQ ID NO:18, respectively. In certain embodiments, the polypeptide is an antibody. In certain embodiments, the polypeptide specifically binds Notch2 and/or Notch3. In some embodiments, the polypeptide specifically binds Notch2 and Notch3.

[00163] The invention further provides a polypeptide comprising SEQ ID NO:13 and/or SEQ ID NO:14. In certain embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and/or a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:14. In some embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:14. In certain embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and/or a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:50. In some embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:50. In certain embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and/or a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:52. In certain embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and/or a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:53. In certain embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and/or a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:54. In certain embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and/or a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:55. In certain embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and/or a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:56. In certain embodiments, the polypeptide comprises a variable light chain sequence comprising SEQ ID NO:13 and/or a variable heavy chain sequence comprising SEQ ID NO:57. In certain embodiments, the polypeptide is an antibody. In certain embodiments, the polypeptide specifically binds Notch2 and/or Notch3. In some embodiments, the polypeptide specifically binds Notch2 and Notch3. In some embodiments, the polypeptide specifically binds human Notch2. In some embodiments, the polypeptide specifically binds human Notch3.

[00164] It will be recognized in the art that some amino acid sequences of the invention can be varied without significant effect of the structure or function of the protein. If such differences in sequence are

contemplated, it should be remembered that there will be critical areas on the protein which determine activity. Thus, the invention further includes variations of the polypeptides which show substantial activity. Such mutants include deletions, insertions, inversions, repeats, and type substitutions. Guidance concerning which amino acid changes are likely to be phenotypically silent can be found in Bowie et al., Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions, 1990, *Science* 247:1306-1310.

[00165] Thus, the fragments, derivatives, or analogs of the polypeptides of the invention can be: (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (often a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue can or cannot be one encoded by the genetic code; or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group; or (iii) one in which the mature polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (for example, polyethylene glycol); or (iv) one in which the additional amino acids are fused to the mature polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature polypeptide or a proprotein sequence. Such fragments, derivatives, and analogs are deemed to be within the scope of the teachings herein.

[00166] Of particular interest are substitutions of a charged amino acid with another charged amino acid and with neutral or negatively charged amino acid. The latter results in proteins with reduced positive charge. Reduced positive charge on a protein can lead to reduction in protein aggregation and the prevention of aggregation is highly desirable. Aggregation of proteins can not only result in a loss of activity but can also be problematic when preparing pharmaceutical formulations, because aggregates can be immunogenic. (Pinckard et al., 1967, *Clin. Exp. Immunol.* 2:331-340; Robbins et al., 1987, *Diabetes* 36:838-845; Cleland et al., 1993, *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10:307-377).

[00167] As indicated, amino acid changes are typically of a minor nature, such as conservative amino acid substitutions that do not significantly affect the folding or activity of the protein (see Table 1.)

Table 1. Conservative Amino Acid Substitutions

Original Amino Acid	Exemplary Conservative Substitutions
Alanine	Valine, Isoleucine, Leucine, Glycine, Serine
Arginine	Lysine, Histidine, Glutamine, Asparagine
Asparagine	Glutamine, Histidine, Lysine, Arginine
Aspartic Acid	Glutamic Acid, Asparagine
Cysteine	Serine, Alanine, Methionine
Glutamine	Asparagine
Glutamic Acid	Aspartic Acid, Glutamine
Glycine	Proline, Alanine
Histidine	Asparagine, Glutamine, Lysine, Arginine
Isoleucine	Leucine, Valine, Methionine, Alanine, Phenylalanine, Norleucine
Leucine	Norleucine, Isoleucine, Valine, Methionine, Alanine, Phenylalanine
Lysine	Arginine, Glutamine, Asparagine, Histidine
Methionine	Leucine, Phenylalanine, Isoleucine, Valine, Cysteine
Phenylalanine	Leucine, Valine, Isoleucine, Alanine, Tyrosine
Proline	Alanine, Glycine
Serine	Threonine
Threonine	Serine
Trytophan	Tyrosine, Phenylalanine
Tyrosine	Tryptophan, Phenylalanine, Threonine, Serine
Valine	Isoleucine, Methionine, Leucine, Phenylalanine, Alanine, Norleucine

[00168] Of course, the number of amino acid substitutions made depends on many factors, including those described above. In certain embodiments, the number of substitutions for any given polypeptide will not be more than 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, or 3.

[00169] In certain embodiment, the polypeptides and polynucleotides of the present invention are provided in an isolated form, and at times are purified to homogeneity.

[00170] The polypeptides of the present invention include the polypeptides of SEQ ID NOs: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, or 57 as well as polypeptides which have at least 90% similarity (at certain times at least 90% sequence identity) to the polypeptides of SEQ ID NOs: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, or 57 and at least 95% similarity (at certain times at least 95% sequence identity) to the polypeptides of SEQ ID NOs: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, or 57 and in still other embodiments, polypeptide which have at least 96%, 97%, 98%, or 99% similarity (at certain times 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to the polypeptides of SEQ ID NOs: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, or 57. As known in the art, "similarity" between two polypeptides is determined by comparing the amino acid sequence and its conserved amino acid substitutes of one polypeptide to the sequence of a second polypeptide.

[00171] Fragments or portions of the polypeptides of the present invention can be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, the fragments can be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides. Fragments or portions of the polynucleotides of the present invention can be used to synthesize full-length polynucleotides of the present invention.

[00172] In certain embodiments, a fragment of the proteins of this invention is a portion or all of a protein which is capable of binding to a Notch receptor protein. This fragment has a high affinity for a Notch receptor or a ligand of a Notch receptor. Certain fragments of fusion proteins are protein fragments comprising at least part of the Notch binding domain of the polypeptide agent or antagonist fused to at least part of a constant region of an immunoglobulin. The affinity is typically in the range of about 10^{-11} to 10^{-12} M, although the affinity can vary considerably with fragments of different sizes, ranging from 10^{-7} to 10^{-13} M. In some embodiments, the fragment is about 10-110 amino acids in length and comprises the Notch binding domain of the polypeptide agent or antagonist linked to at least part of a constant region of an immunoglobulin.

[00173] The polypeptides and analogs can be further modified to contain additional chemical moieties not normally part of the protein. Those derivatized moieties can improve the solubility, the biological half life or absorption of the protein. The moieties can also reduce or eliminate any undesirable side effects of the proteins and the like. An overview for those moieties can be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

[00174] The isolated polypeptides described herein can be produced by any suitable method known in the art. Such methods range from direct protein synthesis methods, to constructing a DNA sequence encoding isolated polypeptide sequences and expressing those sequences in a suitable transformed host.

[00175] In some embodiments of a recombinant method, a DNA sequence is constructed by isolating or synthesizing a DNA sequence encoding a wild-type protein of interest. Optionally, the sequence can be mutagenized by site-specific mutagenesis to provide functional analogs thereof. See, e.g. Zoeller et al., 1984, *Proc. Nat Acad. Sci. USA* 81:5662-5066 and U.S. Pat. No. 4,588,585. Another method of

constructing a DNA sequence encoding a polypeptide of interest would be by chemical synthesis using an oligonucleotide synthesizer. Such oligonucleotides can be designed based on the amino acid sequence of the desired polypeptide and selecting those codons that are favored in the host cell in which the recombinant polypeptide of interest will be produced.

[00176] Standard methods can be applied to synthesize an isolated polynucleotide sequence encoding an isolated polypeptide of interest. For example, a complete amino acid sequence can be used to construct a back-translated gene. Further, a DNA oligomer containing a nucleotide sequence coding for the particular isolated polypeptide can be synthesized. For example, several small oligonucleotides coding for portions of the desired polypeptide can be synthesized and then ligated. The individual oligonucleotides typically contain 5' or 3' overhangs for complementary assembly.

[00177] Once assembled (by synthesis, site-directed mutagenesis, or another method), the mutant DNA sequences encoding a particular isolated polypeptide of interest will be inserted into an expression vector and operatively linked to an expression control sequence appropriate for expression of the protein in a desired host. Proper assembly can be confirmed by nucleotide sequencing, restriction mapping, and expression of a biologically active polypeptide in a suitable host. As is well known in the art, in order to obtain high expression levels of a transfected gene in a host, the gene is operatively linked to transcriptional and translational expression control sequences that are functional in the chosen expression host.

[00178] Recombinant expression vectors may be used to amplify and express DNA encoding polypeptides. Recombinant expression vectors are replicable DNA constructs which have synthetic or cDNA-derived DNA fragments encoding a Notch receptor fusion or a bioequivalent analog operatively linked to suitable transcriptional or translational regulatory elements derived from mammalian, microbial, viral or insect genes. A transcriptional unit generally comprises an assembly of (1) a genetic element or elements having a regulatory role in gene expression, for example, transcriptional promoters or enhancers, (2) a structural or coding sequence which is transcribed into mRNA and translated into protein, and (3) appropriate transcription and translation initiation and termination sequences, as described in detail below. Such regulatory elements can include an operator sequence to control transcription. An origin of replication which usually confers the ability to replicate in a host and a selection gene to facilitate recognition of transformants can additionally be incorporated. DNA regions are operatively linked when they are functionally related to each other. For example, DNA for a signal peptide (secretory leader) is operatively linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a precursor which participates in the secretion of the polypeptide; a promoter is operatively linked to a coding sequence if it controls the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operatively linked to a coding sequence if it is positioned so as to permit translation. Generally, "operatively linked" means contiguous and, in the case of secretory leaders, means contiguous and in reading frame. Structural elements intended for use in yeast

expression systems include a leader sequence enabling extracellular secretion of translated protein by a host cell. Alternatively, where recombinant protein is expressed without a leader or transport sequence, it can include an N-terminal methionine residue. This residue can optionally be subsequently cleaved from the expressed recombinant protein to provide a final product.

[00179] The choice of expression control sequence and expression vector will depend upon the choice of host. A wide variety of expression host/vector combinations can be employed. Useful expression vectors for eukaryotic hosts, include, for example, vectors comprising expression control sequences from SV40, bovine papilloma virus, adenovirus and cytomegalovirus. Useful expression vectors for bacterial hosts include known bacterial plasmids, such as plasmids from *Esherichia coli*, including pCR1, pBR322, pMB9 and their derivatives, and wider host range plasmids, such as M13 and filamentous single-stranded DNA phages.

[00180] Suitable host cells for expression of a polypeptide include prokaryotes, yeast, insect or higher eukaryotic cells under the control of appropriate promoters. Prokaryotes include gram negative or gram positive organisms, for example *E. coli* or *Bacilli*. Higher eukaryotic cells include established cell lines of mammalian origin as described herein. Cell-free translation systems could also be employed. Appropriate cloning and expression vectors for use with bacterial, fungal, yeast, and mammalian cellular hosts are described by Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), the relevant disclosure of which is hereby incorporated by reference.

[00181] Various mammalian or insect cell culture systems are also advantageously employed to express recombinant protein. Expression of recombinant proteins in mammalian cells can be performed because such proteins are generally correctly folded, appropriately modified and completely functional. Examples of suitable mammalian host cell lines include the COS-7 lines of monkey kidney cells, described by Gluzman 1981, *Cell* 23:175, and other cell lines capable of expressing an appropriate vector including, for example, L cells, C127, 3T3, Chinese hamster ovary (CHO), HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors can comprise nontranscribed elements such as an origin of replication, a suitable promoter and enhancer linked to the gene to be expressed, and other 5' or 3' flanking nontranscribed sequences, and 5' or 3' nontranslated sequences, such as necessary ribosome binding sites, a polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, and transcriptional termination sequences. Baculovirus systems for production of heterologous proteins in insect cells are reviewed by Luckow and Summers, 1988, *Bio/Technology* 6:47.

[00182] The proteins produced by a transformed host can be purified according to any suitable method. Such standard methods include chromatography (e.g., ion exchange, affinity and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for protein purification. Affinity tags such as hexahistidine, maltose binding domain, influenza coat sequence and glutathione-S-transferase can be attached to the protein to allow easy purification by passage over an

appropriate affinity column. Isolated proteins can also be physically characterized using such techniques as proteolysis, nuclear magnetic resonance and x-ray crystallography.

[00183] For example, supernatants from systems which secrete recombinant protein into culture media can be first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. Following the concentration step, the concentrate can be applied to a suitable purification matrix. Alternatively, an anion exchange resin can be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) groups. The matrices can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose or other types commonly employed in protein purification. Alternatively, a cation exchange step can be employed. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. Finally, one or more reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify a cancer stem cell protein-Fc composition. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations, can also be employed to provide a homogeneous recombinant protein.

[00184] Recombinant protein produced in bacterial culture is usually isolated by initial extraction from cell pellets, followed by one or more concentration, salting-out, aqueous ion exchange or size exclusion chromatography steps. High performance liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps. Microbial cells employed in expression of a recombinant protein can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

[00185] In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist comprises an antibody. In certain embodiments, the antibody is isolated. In certain embodiments, the antibody is substantially pure.

[00186] The present invention provides antibodies that compete for specific binding to human Notch2 and/or Notch3 with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:14 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:13. The present invention also provides antibodies that compete for specific binding to human Notch2 and/or Notch3 with an antibody that comprises, consists, or consists essentially of a 59R1 IgG2 antibody comprising the heavy chain and light chain of SEQ ID NOs:16 and 18 (with or without signal sequence), respectively, or as encoded by the DNA deposited with the ATCC on October, 15, 2008, and assigned designation number PTA-9547.

[00187] The invention further provides antibodies that specifically bind to one or more Notch receptors, that comprise one, two, three, four, five, and/or six CDRs of SEQ ID NOs:5-10, 22-27, 30 or 51 with up to four (i.e., 0, 1, 2, 3, or 4) conservative amino acid substitutions (see, e.g., Table 1) per CDR. The invention also provides antibodies that specifically bind to one or more Notch receptors, that comprise one, two, three, four, five, and/or six CDRs of 59R1 (i.e., SEQ ID NOs:5-10), with up to four conservative amino acid substitutions per CDR. Thus, the invention provides antibodies that specifically bind to one or

more human Notch receptors that comprise one, two, three, four, five and/or six of the CDRs of 59R1. In certain embodiments, the antibodies comprise the heavy chain CDR3 of 59R1, with up to four conservative amino acid substitutions, and/or the light chain CDR3 of 59R1, with up to four conservative amino acid substitutions. In some embodiments, the antibody comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or a heavy chain CDR3 comprising GIFFAI (SEQ ID NO:7), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions.

[00188] The invention also provides antibodies that specifically bind to one or more Notch receptors, that comprise one, two, three, four, five, and/or six CDRs of 59R5 (i.e., SEQ ID NOs: 5, 6, 8-10, 51), with up to four conservative amino acid substitutions per CDR. In certain embodiments, the antibodies comprise the heavy chain CDR3 of 59R5, with up to four conservative amino acid substitutions, and/or the light chain CDR3 of 59R5, with up to four conservative amino acid substitutions. In some embodiments, the antibody comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or a heavy chain CDR3 comprising SIFYTT (SEQ ID NO:51), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions. In certain embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and/or a heavy chain CDR3 comprising SIFYTT (SEQ ID NO:51).

[00189] Also provided is an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and/or a heavy chain CDR3 comprising (G/I)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30). In certain embodiments, the heavy chain CDR3 is selected from the group consisting of SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS

(SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26), and SSFFAN (SEQ ID NO:27). In certain embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and/or a heavy chain CDR3 comprising GIFFAI (SEQ ID NO:7). In certain embodiments, the heavy chain CDR(s) are contained within a variable region of an antibody heavy chain. In certain embodiments, the antibody further comprises a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). In certain embodiments, the light chain CDR(s) are contained within a variable region of an antibody light chain. In certain embodiments, the heavy chain CDR(s) and/or the light chain CDR(s) have been modified with 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions. In certain embodiments, each of the CDR(s) have been modified by no more than 1-2 conservative amino acid substitutions.

[00190] For example, in certain embodiments, the invention provides an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and a heavy chain CDR3 comprising GIFFAI (SEQ ID NO:7); and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). In some embodiments, the antibody comprises both the indicated light and heavy chain CDRs.

[00191] In some embodiments, the invention provides an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and a heavy chain CDR3 comprising SIFYTT (SEQ ID NO:51); and/or (b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). In certain embodiments, the antibody comprises both the indicated light and heavy chain CDRs.

[00192] The invention further provides an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and/or a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

[00193] The invention also provides an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises: (a) a polypeptide having at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 98% sequence identity to SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:20; and/or (b) a polypeptide having at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 98% sequence identity to SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:19. Accordingly, in certain embodiments, the antibody comprises (a) a heavy chain variable region having at least about 95%

sequence identity to SEQ ID NO:14; and/or (b) a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:13. In certain embodiments, the antibody comprises: (a) a polypeptide (e.g., a heavy chain variable region) comprising SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:20; and/or (b) a polypeptide (e.g., a light chain variable region) comprising SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:19.

[00194] The invention also provides an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises: (a) a polypeptide having at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 98% sequence identity to SEQ ID NO:50; and/or (b) a polypeptide having at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 98% sequence identity to SEQ ID NO:13. Accordingly, in certain embodiments, the antibody comprises (a) a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:50; and/or (b) a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:13. In certain embodiments, the antibody comprises: (a) a polypeptide (e.g., a heavy chain variable region) comprising SEQ ID NO:50; and/or (b) a polypeptide (e.g., a light chain variable region) comprising SEQ ID NO:13.

[00195] In certain embodiments, the antagonists are antibodies that can mediate complement-dependent cytotoxicity or antibody-dependent cellular cytotoxicity to kill tumors expressing a target antigen. In certain alternative embodiments, the antibodies are directly conjugated to toxins or radioisotopes to mediate tumor cell killing. Furthermore, tumor survival depends on neo-vascularization, and in certain embodiments, the antibodies have an anti-angiogenic effect.

[00196] The present invention provides isolated antibodies against a Notch receptor such as human Notch2 and/or Notch3. The antibody, or antibody fragment, can be any monoclonal or polyclonal antibody that specifically recognizes the described Notch receptor. In some embodiments, the present invention provides monoclonal antibodies, or fragments thereof, that specifically bind to a Notch receptor described herein. In some embodiments, the monoclonal antibodies, or fragments thereof, are chimeric or humanized antibodies that specifically bind to the extracellular domain of a Notch receptor described herein. In other embodiments, the monoclonal antibodies, or fragments thereof, are human antibodies that specifically bind to the extracellular domain of a Notch receptor described herein. In certain embodiments, the antibodies are IgG1 or IgG2 antibodies.

[00197] The antibodies against a Notch receptor find use in the experimental, diagnostic and therapeutic methods described herein. In certain embodiments, the antibodies of the present invention are used to detect the expression of a Notch receptor in biological samples such as, for example, a patient tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample. Tissue biopsies can be sectioned and protein detected using, for example, immunofluorescence or immunohistochemistry. Alternatively, individual cells from a sample are isolated, and protein expression detected on fixed or live cells by FACS analysis. Furthermore, the antibodies can be used on protein arrays to detect expression of a Notch receptor, for example, on tumor

cells, in cell lysates, or in other protein samples. In other embodiments, the antibodies of the present invention are used to inhibit the growth of tumor cells by contacting the tumor cells with the antibodies either in *in vitro* cell based assays or *in vivo* animal models. In still other embodiments, the antibodies are used to treat cancer in a human patient by administering a therapeutically effective amount of an antibody against a Notch receptor.

[00198] Polyclonal antibodies can be prepared by any known method. Polyclonal antibodies are raised by immunizing an animal (e.g. a rabbit, rat, mouse, donkey, goat, etc.) by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of the relevant antigen (a purified peptide fragment, full-length recombinant protein, fusion protein, etc.) optionally conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH), serum albumin, etc. diluted in sterile saline and combined with an adjuvant (e.g. Complete or Incomplete Freund's Adjuvant) to form a stable emulsion. The polyclonal antibody is then recovered from blood, ascites and the like, of an animal so immunized. Collected blood is clotted, and the serum decanted, clarified by centrifugation, and assayed for antibody titer. The polyclonal antibodies can be purified from serum or ascites according to standard methods in the art including affinity chromatography, ion-exchange chromatography, gel electrophoresis, dialysis, etc.

[00199] Monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495. Using the hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is immunized as described above to elicit the production by lymphocytes of antibodies that will specifically bind to an immunizing antigen. Alternatively, lymphocytes can be immunized *in vitro*. Following immunization, the lymphocytes are isolated and fused with a suitable myeloma cell line using, for example, polyethylene glycol, to form hybridoma cells that can then be selected away from unfused lymphocytes and myeloma cells. Hybridomas that produce monoclonal antibodies directed specifically against a chosen antigen as determined by immunoprecipitation, immunoblotting, or by an *in vitro* binding assay such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can then be propagated either *in vitro* culture using standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) or *in vivo* as ascites tumors in an animal. The monoclonal antibodies can then be purified from the culture medium or ascites fluid as described for polyclonal antibodies above.

[00200] Alternatively monoclonal antibodies can also be made using recombinant DNA methods as described in U.S. Pat. No. 4,816,567. The polynucleotides encoding a monoclonal antibody are isolated from mature B-cells or hybridoma cell, such as by RT-PCR using oligonucleotide primers that specifically amplify the genes encoding the heavy and light chains of the antibody, and their sequence is determined using conventional procedures. The isolated polynucleotides encoding the heavy and light chains are then cloned into suitable expression vectors, which when transfected into host cells such as E. coli cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce

immunoglobulin protein, express monoclonal antibodies in the host cells. Also, recombinant monoclonal antibodies or fragments thereof of the desired species can be isolated from phage display libraries, e.g., as described herein.

[00201] The polynucleotide(s) encoding a monoclonal antibody can further be modified in a number of different manners using recombinant DNA technology to generate alternative antibodies. In some embodiments, the constant domains of the light and heavy chains of, for example, a mouse monoclonal antibody can be substituted 1) for those regions of, for example, a human antibody to generate a chimeric antibody or 2) for a non-immunoglobulin polypeptide to generate a fusion antibody. In other embodiments, the constant regions are truncated or removed to generate the desired antibody fragment of a monoclonal antibody. Furthermore, site-directed or high-density mutagenesis of the variable region can be used to optimize specificity, affinity, etc. of a monoclonal antibody.

[00202] More generally, modified antibodies useful in the present invention may be obtained or derived from any antibody. Further, the parent or precursor antibody, or fragment thereof, used to generate the disclosed modified antibodies may be murine, human, chimeric, humanized, non-human primate or primatized. In other embodiments the modified antibodies of the present invention can comprise single chain antibody constructs (such as that disclosed in U.S. Pat. No. 5,892,019, which is incorporated herein by reference) having altered constant domains as described herein. Consequently, any of these types of antibodies modified in accordance with the teachings herein are compatible with this invention.

[00203] According to the present invention, techniques can be adapted for the production of single-chain antibodies specific to a polypeptide of the invention (see U.S. Pat. No. 4,946,778). In addition, methods can be adapted for the construction of Fab expression libraries (Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for Notch, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotypes to a polypeptide of the invention may be produced by techniques in the art including, but not limited to: (a) an $F(ab')_2$ fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule; (b) an Fab fragment generated by reducing the disulfide bridges of an $F(ab')_2$ fragment, (c) an Fab fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent, and (d) Fv fragments.

[00204] Bispecific antibodies are also within the scope of the invention. Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens (or, in certain embodiments, two different epitopes on the same antigen). In the present case, one of the binding specificities is for an antigenic polypeptide of the invention (Notch, or a fragment thereof), while the second binding target is any other antigen, and advantageously is a cell surface protein, or receptor or receptor subunit. Bispecific antibodies that comprise one antigen-binding site that

specifically binds one human Notch receptor (e.g., Notch2) and further comprise a second, different antigen-binding site that specifically binds a second human Notch receptor (e.g., Notch3) are provided.

[00205] Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy chain/light chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Milstein and Cuello, 1983, *Nature* 305:537-539). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography.

[00206] Alternatively, in certain embodiments, the antibodies described herein may be monospecific. For example, in certain embodiments, each of the one or more antigen-binding sites that an antibody contains is capable of binding (or binds) the same one or more human Notch receptors (e.g., Notch2, Notch3, or homologous epitopes on both Notch2 and Notch3). In certain embodiments, an antigen-binding site of a monospecific antibody described herein is capable of binding (or binds) both the EGF repeat 9 of human Notch3 and EGF repeat 10 of Notch2.

[00207] Antibody variable domains with the desired binding specificities can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2 and CH3 regions. The first heavy chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding can be present in at least one of the fusions. DNA encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. Further details of generating bispecific antibodies can be found in Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210.

[00208] Bispecific antibodies can be prepared as full-length antibodies or antibody fragments. Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. In addition, Brennan et al., 1985, *Science* 229:81 describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F(ab')_2$ fragments.

[00209] Additionally, Fab' fragments can be directly recovered from E. coli and chemically coupled to form bispecific antibodies (Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225). These methods can be used in the production of a fully humanized bispecific antibody $F(ab')_2$ molecule.

[00210] Antibodies with more than two valencies are also contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared (Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60).

[00211] Exemplary bispecific antibodies can bind to two different epitopes, at least one of which originates in a polypeptide of the invention. Alternatively, an anti-antigenic arm of an immunoglobulin

molecule can be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular antigen. Bispecific antibodies can also be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular antigen. These antibodies possess an antigen-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA.

[00212] Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune cells to unwanted cells (U.S. Pat. No. 4,676,980). It is contemplated that the antibodies can be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

[00213] For the purposes of the present invention, it should be appreciated that modified antibodies can comprise any type of variable region that provides for the association of the antibody with the polypeptides of Notch. In this regard, the variable region may comprise or be derived from any type of mammal that can be induced to mount a humoral response and generate immunoglobulins against the desired tumor associated antigen. As such, the variable region of the modified antibodies can be, for example, of human, murine, non-human primate (e.g. cynomolgus monkeys, macaques, etc.) or lupine origin. In some embodiments both the variable and constant regions of the modified immunoglobulins are human. In other embodiments the variable regions of compatible antibodies (usually derived from a non-human source) can be engineered or specifically tailored to improve the binding properties or reduce the immunogenicity of the molecule. In this respect, variable regions useful in the present invention can be humanized or otherwise altered through the inclusion of imported amino acid sequences.

[00214] In some embodiments, of the present invention the monoclonal antibody against a Notch receptor is a humanized antibody. Humanized antibodies are antibodies that contain minimal sequences from non-human (e.g., murine) antibodies within the variable regions. Such antibodies are used therapeutically to reduce antigenicity and HAMA (human anti-mouse antibody) responses when administered to a human subject. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies with minimum to no non-human sequences. A human antibody is an antibody produced by a human or an antibody having an amino acid sequence corresponding to an antibody produced by a human.

[00215] Humanized antibodies can be produced using various techniques known in the art. An antibody can be humanized by substituting the CDR of a human antibody with that of a non-human antibody (e.g., mouse, rat, rabbit, hamster, etc.) having the desired specificity, affinity, and/or capability (Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, *Science*

239:1534-1536). The humanized antibody can be further modified by the substitution of additional residues either in the Fv framework region and/or within the replaced non-human residues to refine and optimize antibody specificity, affinity, and/or capability.

[00216] As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. Human antibodies can be prepared using various techniques known in the art, including from transgenic animals, phage libraries, and *in vitro* activated human B cells.

[00217] For example, it is now possible to produce transgenic animals (e.g., mice) containing human immunoglobulin loci that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array into such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, e.g., Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362:255-258; Bruggemann et al., 1993, *Year in Immuno.* 7:33; U.S. Pat. Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669; 5,545,807; 5,545,807; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016; and WO 97/17852.

[00218] Alternatively, phage display technology can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats. Several sources of V-gene segments can be used for phage display. A diverse array of anti-oxazolone antibodies have been isolated from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated. Methods of selecting human antibodies from a phage library, where that phage library expresses human antibodies are well known in the art (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS* 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; McCafferty et al., 1990, *Nature* 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature* 352:624-628; and Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597). Techniques for the generation and use of antibody phage libraries are also described in U.S. Patent Nos. 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; and 7,264,963; and Rothe et al., 2008, *J. Mol. Bio.* 376:1182-

1200 (each of which is incorporated by reference in its entirety). Affinity maturation strategies, such as chain shuffling (Marks et al., 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, incorporated by reference in its entirety), are known in the art and may be employed to generate high affinity human antibodies.

[00219] Human antibodies can also be directly prepared using various techniques known in the art. Immortalized human B lymphocytes immunized *in vitro* or isolated from an immunized individual that produce an antibody directed against a target antigen can be generated. (See, for example, Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77; Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; U.S. Pat. Nos. 5,750,373; 5,567,610; and 5,229,275).

[00220] It will be appreciated that grafting the entire non-human variable domains onto human constant regions will produce "classic" chimeric antibodies. In the context of the present application the term "chimeric antibodies" will be held to mean any antibody wherein the immunoreactive region or site is obtained or derived from a first species and the constant region (which may be intact, partial or modified in accordance with this invention) is obtained from a second species. In some embodiments, the antigen binding region or site will be from a non-human source (e.g., mouse) and the constant region is human. While the immunogenic specificity of the variable region is not generally affected by its source, a human constant region is less likely to elicit an immune response from a human subject than would the constant region from a non-human source.

[00221] The variable domains in both the heavy and light chains are altered by at least partial replacement of one or more CDRs and, if necessary, by partial framework region replacement and sequence modification. Although the CDRs may be derived from an antibody of the same class or even subclass as the antibody from which the framework regions are derived, it is envisaged that the CDRs will be derived from an antibody of different class and preferably from an antibody from a different species. It must be emphasized that it may not be necessary to replace all of the CDRs with the complete CDRs from the donor variable region to transfer the antigen binding capacity of one variable domain to another. Rather, it may only be necessary to transfer those residues that are necessary to maintain the activity of the antigen binding site. Given the explanations set forth in U.S. Pat. Nos. 5,585,089; 5,693,761; and 5,693,762, it will be well within the art, either by carrying out routine experimentation or by trial and error testing to obtain a functional antibody with reduced immunogenicity.

[00222] Alterations to the variable region notwithstanding, it will be appreciated that the modified antibodies of this invention will comprise antibodies, or immunoreactive fragments thereof, in which at least a fraction of one or more of the constant region domains has been deleted or otherwise altered so as to provide desired biochemical and/or biological characteristics such as increased tumor localization or reduced serum half-life when compared with an antibody of approximately the same immunogenicity comprising a native or unaltered constant region. In some embodiments, the constant region of the modified antibodies will comprise a human constant region. Modifications to the constant region

compatible with this invention comprise additions, deletions or substitutions of one or more amino acids in one or more domains. That is, the modified antibodies disclosed herein may comprise alterations or modifications to one or more of the three heavy chain constant domains (CH1, CH2 or CH3) and/or to the light chain constant domain (CL). In some embodiments of the invention, modified constant regions wherein one or more domains are partially or entirely deleted are contemplated. In other embodiments, the modified antibodies will comprise domain deleted constructs or variants wherein the entire CH2 domain has been removed (ΔCH2 constructs). In still other embodiments, the omitted constant region domain will be replaced by a short amino acid spacer (e.g., 10 residues) that provides some of the molecular flexibility typically imparted by the absent constant region.

[00223] Besides their configuration, it is known in the art that the constant region mediates several effector functions. For example, binding of the C1 component of complement to antibodies activates the complement system. Activation of complement is important in the opsonization and lysis of cell pathogens. The activation of complement also stimulates the inflammatory response and can also be involved in autoimmune hypersensitivity. Further, antibodies bind to cells via the Fc region, with a Fc receptor site on the antibody Fc region binding to a Fc receptor (FcR) on a cell. There are a number of Fc receptors which are specific for different classes of antibody, including IgG (gamma receptors), IgE (epsilon receptors), IgA (alpha receptors) and IgM (mu receptors). Binding of antibody to Fc receptors on cell surfaces triggers a number of important and diverse biological responses including engulfment and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, lysis of antibody-coated target cells by killer cells (called antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, or ADCC), release of inflammatory mediators, placental transfer and control of immunoglobulin production. Although various Fc receptors and receptor sites have been studied to a certain extent, there is still much which is unknown about their location, structure and functioning.

[00224] While not limiting the scope of the present invention, it is believed that antibodies comprising constant regions modified as described herein provide for altered effector functions that, in turn, affect the biological profile of the administered antibody. For example, the deletion or inactivation (through point mutations or other means) of a constant region domain may reduce Fc receptor binding of the circulating modified antibody thereby increasing tumor localization. In other cases it may be that constant region modifications, consistent with this invention, moderate complement binding and thus reduce the serum half life and nonspecific association of a conjugated cytotoxin. Yet other modifications of the constant region may be used to eliminate disulfide linkages or oligosaccharide moieties that allow for enhanced localization due to increased antigen specificity or antibody flexibility. Similarly, modifications to the constant region in accordance with this invention may easily be made using well known biochemical or molecular engineering techniques.

[00225] It will be noted that the modified antibodies may be engineered to fuse the CH3 domain directly to the hinge region of the respective modified antibodies. In other constructs it may be desirable to provide a peptide spacer between the hinge region and the modified CH2 and/or CH3 domains. For example, compatible constructs could be expressed wherein the CH2 domain has been deleted and the remaining CH3 domain (modified or unmodified) is joined to the hinge region with a 5-20 amino acid spacer. Such a spacer may be added, for instance, to ensure that the regulatory elements of the constant domain remain free and accessible or that the hinge region remains flexible. However, it should be noted that amino acid spacers may, in some cases, prove to be immunogenic and elicit an unwanted immune response against the construct. Accordingly, any spacer added to the construct should be relatively non-immunogenic or, even omitted altogether if the desired biochemical and/or biological qualities of the modified antibodies are to be maintained.

[00226] Besides the deletion of whole constant region domains, it will be appreciated that the antibodies of the present invention may be provided by the partial deletion or substitution of a few or even a single amino acid. For example, the mutation of a single amino acid in selected areas of the CH2 domain may be enough to substantially reduce Fc binding and thereby increase tumor localization. Similarly, it may be desirable to simply delete that part of one or more constant region domains that control the effector function (e.g., complement Clq binding) to be modulated. Such partial deletions of the constant regions may improve selected characteristics of the antibody (serum half-life) while leaving other desirable functions associated with the subject constant region domain intact. Moreover, as alluded to above, the constant regions of the disclosed antibodies may be modified through the mutation or substitution of one or more amino acids that enhances the profile of the resulting construct. In this respect it may be possible to disrupt the activity provided by a conserved binding site (e.g., Fc binding) while substantially maintaining the configuration and immunogenic profile of the modified antibody. Yet other embodiments may comprise the addition of one or more amino acids to the constant region to enhance desirable characteristics such as effector function or provide for more cytotoxin or carbohydrate attachment. In such embodiments it can be desirable to insert or replicate specific sequences derived from selected constant region domains.

[00227] This invention also encompasses bispecific antibodies that specifically recognize a Notch receptor. Bispecific antibodies are antibodies that are capable of specifically recognizing and binding at least two different epitopes. The different epitopes can either be within the same molecule (e.g., the same Notch receptor polypeptide) or on different molecules. For example, the antibodies can specifically recognize and bind a Notch receptor as well as, for example, 1) an effector molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor (e.g., CD3) or Fc receptor (e.g., CD64, CD32, or CD16) or 2) a cytotoxic agent as described in detail herein. Bispecific antibodies can be intact antibodies or antibody fragments. Techniques for making bispecific antibodies are common in the art (Millstein et al., 1983, *Nature*

305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science* 229:81; Suresh et al, 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.* 152:5368; and U.S. Pat. No. 5,731,168).

[00228] In certain embodiments of the invention, it can be desirable to use an antibody fragment, rather than an intact antibody, to increase tumor penetration, for example. Various techniques are known for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments are derived via proteolytic digestion of intact antibodies (for example Morimoto et al., 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 and Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81). However, these fragments are now typically produced directly by recombinant host cells as described herein. Thus Fab, Fv, and scFv antibody fragments can all be expressed in and secreted from *E. coli* or other host cells, thus allowing the production of large amounts of these fragments. Alternatively, such antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed herein. The antibody fragments can also be linear antibodies as described in U.S. Pat. No. 5,641,870, for example, and can be monospecific or bispecific. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent.

[00229] It can further be desirable, especially in the case of antibody fragments, to modify an antibody in order to increase its serum half-life. This can be achieved, for example, by incorporation of a salvage receptor binding epitope into the antibody fragment by mutation of the appropriate region in the antibody fragment or by incorporating the epitope into a peptide tag that is then fused to the antibody fragment at either end or in the middle (e.g., by DNA or peptide synthesis).

[00230] The present invention further embraces variants and equivalents which are substantially homologous to the chimeric, humanized and human antibodies, or antibody fragments thereof, set forth herein. These can contain, for example, conservative substitution mutations, i.e. the substitution of one or more amino acids by similar amino acids. For example, conservative substitution refers to the substitution of an amino acid with another within the same general class such as, for example, one acidic amino acid with another acidic amino acid, one basic amino acid with another basic amino acid or one neutral amino acid by another neutral amino acid. What is intended by a conservative amino acid substitution is well known in the art.

[00231] The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent. Cytotoxic agents include chemotherapeutic agents, growth inhibitory agents, toxins (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), radioactive isotopes (i.e., a radioconjugate), etc. Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates include, for example, methotrexate, adriamicin, doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin,

exotoxin A chain, ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), Momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, Sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyidithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis(p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as a calicheamicin, maytansinoids, a trichothene, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, can also be used.

[00232] Conjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune cells to unwanted cells (U.S. Pat. No. 4,676,980). It is contemplated that the antibodies can be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

[00233] In some embodiments, the antibody of the invention contains human Fc regions that are modified to enhance effector function, for example, antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement dependent cytotoxicity (CDC). This can be achieved by introducing one or more amino acid substitutions in an Fc region of the antibody. For example, cysteine residue(s) can be introduced in the Fc region to allow interchain disulfide bond formation in this region to improve complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (Caron et al., 1992, *J. Exp Med.* 176:1191-1195; Shopes, 1992, *Immunol.* 148:2918-2922). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity can also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff et al., 1993, *Cancer Research* 53:2560-2565. Alternatively, an antibody can be engineered which has dual Fc regions (Stevenson et al., 1989, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230).

[00234] Regardless of how useful quantities are obtained, the antibodies of the present invention can be used in any one of a number of conjugated (i.e. an immunoconjugate) or unconjugated forms. The antibodies of this invention can be used in a nonconjugated or "naked" form to harness the subject's natural defense mechanisms including complement-dependent cytotoxicity (CDC) and antibody dependent cellular toxicity (ADCC) to eliminate the malignant cells. In some embodiments, the antibodies can be conjugated to radioisotopes, including, but not limited to, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{111}In, ^{131}In, ^{212}Bi, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re and ^{188}Re using any one of a number of well known

chelators or direct labeling. In other embodiments, the disclosed compositions can comprise antibodies coupled to drugs, prodrugs or biological response modifiers such as methotrexate, adriamycin, and lymphokines such as interferon. Still other embodiments of the present invention comprise the use of antibodies conjugated to specific biotoxins such as ricin or diptheria toxin. In yet other embodiments the modified antibodies can be complexed with other immunologically active ligands (e.g., antibodies or fragments thereof) wherein the resulting molecule binds to both the neoplastic cell and an effector cell such as a T cell. The selection of which conjugated or unconjugated modified antibody to use will depend of the type and stage of cancer, use of adjunct treatment (e.g., chemotherapy or external radiation) and patient condition. It will be appreciated that one could readily make such a selection in view of the teachings herein.

[00235] The preparation and characterization of anti-Notch antibodies is also taught, e.g., in U.S. Patent Application Publication No. 2008/0131434, which is incorporated by reference herein in its entirety.

[00236] In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist is a polypeptide that is not an antibody. A variety of methods for identifying and producing non-antibody polypeptides that bind with high affinity to a protein target are known in the art. See, e.g., Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304; Hosse et al., 2006, *Protein Science*, 15:14-27; Gill et al., 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658; Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275:2668-76; and Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275:2677-83, each of which is incorporated by reference herein in its entirety. In certain embodiments, phage display technology has been used to identify/produce the Notch-binding polypeptide. In certain embodiments, the polypeptide comprises a protein scaffold of a type selected from the group consisting of protein A, a lipocalin, a fibronectin domain, an ankyrin consensus repeat domain, and thioredoxin.

[00237] In some embodiments, the agent is a non-protein molecule. In certain embodiments, the agent is a small molecule. Combinatorial chemistry libraries and techniques useful in the identification of non-protein Notch-binding agents are known to those skilled in the art. See, e.g., Kennedy et al., 2008, *J. Comb. Chem*, 10:345-354; Dolle et al, 2007, *J. Comb. Chem.*, 9:855-902; and Bhattacharyya, 2001, *Curr. Med. Chem.*, 8:1383-404, each of which is incorporated by reference herein in its entirety. In certain further embodiments, the agent is a carbohydrate, a glycosaminoglycan, a glycoprotein, or a proteoglycan.

[00238] In certain embodiments, the agent is a nucleic acid aptamer. Aptamers are polynucleotide molecules that have been selected (e.g., from random or mutagenized pools) on the basis of their ability to bind to another molecule. In some embodiments, the aptamer comprises a DNA polynucleotide. In certain alternative embodiments, the aptamer comprises an RNA polynucleotide. In certain embodiments, the aptamer comprises one or more modified nucleic acid residues. Methods of generating and screening nucleic acid aptamers for binding to proteins are well known in the art. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,270,163; 5,683,867; 5,763,595; 6,344,321; 7,368,236; 5,582,981; 5,756,291; 5,840,867; 7,312,325; and 7,329,742; International Patent Publication Nos. WO 02/077262; WO 03/070984; U.S. Patent Application

Publication Nos. 2005/0239134; 2005/0124565; and 2008/0227735, each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

[00239] The antibodies of the present invention can be assayed for immunospecific binding by any method known in the art. The immunoassays which can be used include, but are not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as Biacore analysis, FACS analysis, immunofluorescence, immunocytochemistry, Western blot analysis, radioimmunoassay, ELISA, "sandwich" immunoassay, immunoprecipitation assay, precipitin reaction, gel diffusion precipitin reaction, immunodiffusion assay, agglutination assay, complement-fixation assay, immunoradiometric assay, fluorescent immunoassay, and protein A immunoassay. Such assays are routine and well known in the art (see, e.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, which is incorporated by reference herein in its entirety).

[00240] In some embodiments, of the present invention the immunospecificity of an antibody against a Notch receptor is determined using ELISA. An ELISA assay comprises preparing antigen, coating wells of a 96 well microtiter plate with antigen, adding the antibody against a Notch receptor conjugated to a detectable compound such as an enzymatic substrate (e.g., horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) to the well, incubating for a period of time and detecting the presence of the antigen. Alternatively the antibody against a Notch receptor is not conjugated to a detectable compound, but instead a second conjugated antibody that recognizes the antibody against a Notch receptor is added to the well. Further, instead of coating the well with the antigen, the antibody against a Notch receptor can be coated to the well and a second antibody conjugated to a detectable compound can be added following the addition of the antigen to the coated well. The parameters that can be modified to increase the signal detected, as well as other variations of ELISAs are well known in the art (see e.g. Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1).

[00241] The binding affinity of an antibody to a Notch receptor and the off-rate of an antibody-antigen interaction can be determined by competitive binding assays. One example of a competitive binding assay is a radioimmunoassay comprising the incubation of labeled antigen (e.g., ^{3}H or ^{125}I), or fragment or variant thereof, with the antibody of interest in the presence of increasing amounts of unlabeled antigen followed by the detection of the antibody bound to the labeled antigen. The affinity of the antibody against a Notch receptor and the binding off-rates can be determined from the data by Scatchard plot analysis. In some embodiments, Biacore kinetic analysis is used to determine the binding on and off rates of antibodies against a Notch receptor. Biacore kinetic analysis comprises analyzing the binding and dissociation of antibodies from chips with immobilized Notch antigens on their surface.

[00242] The invention provides isolated polynucleotides encoding the polypeptides of SEQ ID NOs:2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, or 57 as well as the polynucleotides of SEQ ID NOs: 1, 3, 15, 17, 47 or 48. The polynucleotides of the invention can be in the form of RNA or in the

form of DNA, wherein DNA includes cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA. The DNA can be double-stranded or single-stranded, and if single-stranded it can be the coding strand or non-coding (anti-sense) strand. Thus, the term "polynucleotide encoding a polypeptide" encompasses a polynucleotide which includes only coding sequences for the polypeptide as well as a polynucleotide which includes additional coding and/or non-coding sequences. In some embodiments, the invention provides a polynucleotide that hybridizes to a polynucleotide encoding the polypeptides of SEQ ID NOs:2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, or 57. In some embodiments, the polynucleotides hybridize to the polynucleotides of SEQ ID NOs: 1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 or 60. In some embodiments, the polynucleotides hybridize under stringent hybridization conditions.

[00243] As used herein, the phrases "hybridizes" or "selectively hybridizes" or "specifically hybridizes" refer to the binding or duplexing of a molecule only to a particular nucleotide sequence under stringent hybridization conditions when that sequence is present in a complex mixture (e.g., a library of DNAs or RNAs). See, e.g., Andersen (1998) Nucleic Acid Hybridization Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) Nucleic Acid Hybridization Wiley.

[00244] As used herein, the phrase "stringent hybridization conditions" refers to conditions under which a probe or other polynucleotide will hybridize to its target subsequence or other complementary sequence, typically in a complex mixture of nucleic acid, but generally to no other sequences. Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. Longer sequences hybridize specifically at higher temperatures. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generally, stringent conditions are selected to be about 5-10 °C lower than the thermal melting point (Tm) for the specific sequence at a defined ionic strength. The Tm is the temperature (under defined ionic strength, pH, and nucleic concentration) at which 50% of the probes complementary to the target hybridize to the target sequence at equilibrium (as the target sequences are present in excess, at Tm, 50% of the probes are occupied at equilibrium). Stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.0 M sodium ion, typically about 0.01 to 1.0 M sodium ion concentration (or other salts) at pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30 °C for short probes (e.g., 10 to 50 nucleotides) and at least about 60 °C for long probes (e.g., greater than 50 nucleotides). Stringent conditions can also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. For high stringency hybridization, a positive signal is at least two times background, or 10 times background hybridization. Exemplary high stringency or stringent hybridization conditions include: 50% formamide, 5x SSC, and 1% SDS incubated at 42 °C or 5x SSC and 1% SDS incubated at 65 °C, with a wash in 0.2x SSC and 0.1% SDS at 65 °C. For PCR, a temperature of about 36 °C is typical for low stringency amplification, although annealing temperatures can vary from about 32 °C to about 48 °C depending on primer length. For high stringency PCR

amplification, a temperature of about 62 °C is typical, although high stringency annealing temperatures can range from about 50 °C to about 65 °C, depending on the primer length and specificity. Typical cycle conditions for both high and low stringency amplifications include a denaturation phase of 90 °C to 95 °C for 30-120 sec, an annealing phase lasting 30-120 sec, and an extension phase of about 72 °C for 1-2 min.

[00245] The present invention further relates to variants of the hereinabove described polynucleotides which encode for fragments, analogs, and derivatives. The variant of the polynucleotide can be a naturally occurring allelic variant of the polynucleotide or a non-naturally occurring variant of the polynucleotide.

[00246] As hereinabove indicated, the polynucleotide can have a coding sequence which is a naturally occurring allelic variant of the coding sequence of the disclosed polypeptides. As known in the art, an allelic variant is an alternate form of a polynucleotide sequence which has a substitution, deletion or addition of one or more nucleotides that does not substantially alter the function of the encoded polypeptide.

[00247] The present invention also includes polynucleotides, wherein the coding sequence for the mature polypeptide can be fused in the same reading frame to a polynucleotide which aids in expression and secretion of a polypeptide from a host cell, for example, a leader sequence which functions as a secretory sequence for controlling transport of a polypeptide from the cell. The polypeptide having a leader sequence is a preprotein and can have the leader sequence cleaved by the host cell to form the mature form of the polypeptide. The polynucleotides can also encode for a proprotein which is the mature protein plus additional 5' amino acid residues. A mature protein having a prosequence is a proprotein and is an inactive form of the protein. Once the prosequence is cleaved an active mature protein remains.

[00248] Thus, for example, the polynucleotide of the present invention can encode for a mature protein, or for a protein having a prosequence or for a protein having both a prosequence and presequence (leader sequence).

[00249] The polynucleotides of the present invention can also have the coding sequence fused in frame to a marker sequence which allows for purification of the polypeptide of the present invention. For example, the marker sequence can be a hexa-histidine tag supplied by a pQE-9 vector to provide for purification of the mature polypeptide fused to the marker in the case of a bacterial host. Or for example, the marker sequence can be a hemagglutinin (HA) tag when a mammalian host, e.g. COS-7 cells, is used. The HA tag corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson et al., 1984, *Cell* 37:767).

[00250] Further embodiments of the invention include isolated nucleic acid molecules comprising a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 90% identical, 95% identical, and in some embodiments, at least 96%, 97%, 98% or 99% identical to SEQ ID NOs:1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 or 60. In some embodiments, the polynucleotides comprising a nucleotide sequence at least 90% identical, 95%

identical, and in some embodiments, at least 96%, 97%, 98% or 99% identical hybridize to the polynucleotides of SEQ ID NOs:1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 or 60. In some embodiments, the polynucleotides comprising a nucleotide sequences at least 90% identical, 95% identical, and in some embodiments, at least 96%, 97%, 98% or 99% identical hybridize to the polynucleotides of SEQ ID NOs:58, 59 or 60. In some embodiments, the polynucleotides hybridize under stringent hybridization conditions. In some embodiments, the polynucleotides hybridize to the polynucleotides of SEQ ID NO:58, 59 or 60 under stringent hybridization conditions. By a polynucleotide having a nucleotide sequence at least, for example, 95% "identical" to a reference nucleotide sequence is intended that the nucleotide sequence of the polynucleotide is identical to the reference sequence except that the polynucleotide sequence can include up to five point mutations per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence. In other words, to obtain a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 95% identical to a reference nucleotide sequence, up to 5% of the nucleotides in the reference sequence can be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to 5% of the total nucleotides in the reference sequence can be inserted into the reference sequence. These mutations of the reference sequence can occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

[00251] As a practical matter, whether any particular nucleic acid molecule has a certainty percent sequence identity to a reference sequence (for example, has at least about 80%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 97% sequence identity to a reference sequence or is 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the reference sequence) can be determined conventionally using known computer programs such as the Bestfit program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit uses the local homology algorithm of Smith and Waterman, 1981, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489, to find the best segment of homology between two sequences. When using Bestfit or any other sequence alignment program to determine whether a particular sequence is, for instance, 95% identical to a reference sequence according to the present invention, the parameters are set, of course, such that the percentage of identity is calculated over the full length of the reference nucleotide sequence and that gaps in homology of up to 5% of the total number of nucleotides in the reference sequence are allowed.

[00252] The polynucleotide variants can contain alterations in the coding regions, non-coding regions, or both. In some embodiments the polynucleotide variants contain alterations which produce silent substitutions, additions, or deletions, but do not alter the properties or activities of the encoded polypeptide. In some embodiments, nucleotide variants are produced by silent substitutions due to the degeneracy of the genetic code. Polynucleotide variants can be produced for a variety of reasons, e.g., to

optimize codon expression for a particular host such as changing codons in the human mRNA to those preferred by a bacterial host such as *E. coli*.

[00253] The present invention further provides pharmaceutical compositions comprising antagonists (e.g., antibodies) that target a Notch receptor. These pharmaceutical compositions find use in inhibiting tumor cell growth and treating cancer in human patients.

[00254] Formulations are prepared for storage and use by combining a purified Notch-binding agent or antagonist (e.g., antibody) of the present invention with a pharmaceutically acceptable carrier, excipient, and/or stabilizer as a sterile lyophilized powder, aqueous solution, etc. (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). Suitable carriers, excipients, or stabilizers comprise: nontoxic buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; salts such as sodium chloride; antioxidants such as ascorbic acid and methionine; preservatives such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride, hexamethonium chloride, benzalkonium chloride, benzethonium chloride, phenol, butyl or benzyl alcohol, alkyl parabens, such as methyl or propyl paraben, catechol, resorcinol, cyclohexanol, 3-pentanol; and m-cresol; low molecular weight polypeptides (less than about 10 amino acid residues); proteins such as serum albumin, gelatin, and immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, and lysine; carbohydrates such as monosacchandes, disaccharides, glucose, mannose, and dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose and sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes such as Zn-protein complexes; and/or non-ionic surfactants such as TWEEN and polyethylene glycol (PEG).

[00255] The pharmaceutical composition of the present invention can be administered in any number of ways for either local or systemic treatment. Administration can be topical (such as to mucous membranes including vaginal and rectal delivery) using transdermal patches, ointments, lotions, creams, gels, drops, suppositories, sprays, liquids and powders; pulmonary (e.g., by inhalation or insufflation of powders or aerosols, including by nebulizer; intratracheal, intranasal, epidermal and transdermal); oral; or parenteral including intravenous, intraarterial, subcutaneous, intraperitoneal, intratumoral, or intramuscular injection or infusion; or intracranial (e.g., intrathecal or intraventricular) administration.

[00256] The therapeutic formulation can be in unit dosage form. Such formulations include tablets, pills, capsules, powders, granules, solutions or suspensions in water or non-aqueous media, or suppositories for oral, parenteral, or rectal administration or for administration by inhalation. In solid compositions such as tablets the principal active ingredient is mixed with a pharmaceutical carrier. Conventional tableting ingredients include corn starch, lactose, sucrose, sorbitol, talc, stearic acid, magnesium stearate, dicalcium phosphate or gums, and other diluents (e.g., water) to form a solid preformulation composition containing a homogeneous mixture of a compound of the present invention, or a non-toxic pharmaceutically acceptable salt thereof. The solid preformulation composition is then subdivided into unit dosage forms

of the type described above. The tablets, pills, etc. of the novel composition can be coated or otherwise compounded to provide a dosage form affording the advantage of prolonged action. For example, the tablet or pill can comprise an inner composition covered by an outer component. Furthermore, the two components can be separated by an enteric layer that serves to resist disintegration and permits the inner component to pass intact through the stomach or to be delayed in release. A variety of materials can be used for such enteric layers or coatings, such materials including a number of polymeric acids and mixtures of polymeric acids with such materials as shellac, cetyl alcohol and cellulose acetate.

[00257] Pharmaceutical formulations include antagonists (e.g., antibodies) of the present invention complexed with liposomes (Epstein, et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688; Hwang, et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030; and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545). Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Pat. No. 5,013,556. Some liposomes can be generated by the reverse phase evaporation with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

[00258] The antagonist (e.g., antibody) can also be entrapped in microcapsules. Such microcapsules are prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles and nanocapsules) or in macroemulsions as described in Remington's, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing (2000).

[00259] In addition sustained-release preparations can be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles (e.g., films or microcapsules). Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels such as poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) or poly(v nylalcohol), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and 7 ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the Lupron Depot (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), sucrose acetate isobutyrate, and poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid.

[00260] In certain embodiments, the pharmaceutical compositions comprise both the Notch-binding agent or antagonist and a second therapeutic agent. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an anti-cancer agent and/or an anti-angiogenic agent.

[00261] The present invention provides methods for inhibiting the growth or proliferation of tumorigenic cells expressing a Notch receptor using the Notch receptor antagonists described herein. In some embodiments, the methods comprise inhibiting the growth of tumorigenic cells expressing a Notch2 and/or Notch3 receptor using any one the antibodies or polypeptides described herein. In some

embodiments, the method of inhibiting the growth of tumorigenic cells expressing a Notch receptor comprises contacting the cell with an antagonist against a Notch receptor *in vitro*. For example, an immortalized cell line or a cancer cell line that expresses a Notch receptor is cultured in medium to which is added an antibody which specifically binds to Notch2 and/or Notch3 and inhibits cell growth. Or tumor cells and/or tumor stem cells are isolated from a patient sample such as, for example, a tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample and cultured in medium to which is added an antibody which specifically binds to Notch2 and/or Notch3 and inhibits cell growth. In some embodiments, the antagonist is an antibody that specifically recognizes an epitope of a Notch2 and/or Notch3 receptor.

[00262] In some embodiments, the method of inhibiting the growth or proliferation of tumorigenic cells expressing a Notch receptor comprises contacting the cell with an antagonist against a Notch receptor (e.g., an antagonist of Notch2 and/or Notch3) *in vivo*. In certain embodiments, contacting a tumorigenic cell with an antagonist to a Notch receptor is undertaken in an animal model. For example, xenografts expressing a Notch receptor are grown in immunocompromised mice (e.g., NOD/SCID mice). The mice are administered an antagonist to the Notch receptor to inhibit tumor growth. Alternatively, cancer stem cells that express a Notch receptor are isolated from a patient sample such as, for example, a tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample and injected into immunocompromised mice. The mice are then administered an antagonist against the Notch receptor to inhibit tumor cell growth. In some embodiments, the antagonist of a Notch receptor is administered at the same time or shortly after introduction of tumorigenic cells into the animal to prevent tumor growth. In other embodiments, the antagonist of a Notch receptor is administered as a therapeutic after the tumorigenic cells have grown to a specified size. In some embodiments, the antagonist is a Notch receptor protein fusion that specifically binds to a Notch receptor. In certain embodiments, the antagonist is an antibody that specifically recognizes an epitope of a Notch receptor. In some embodiments, the antibody is any one of the antibodies or polypeptides described herein.

[00263] In certain embodiments, contacting a tumorigenic cell with an antagonist to a Notch receptor is undertaken in a human patient diagnosed with cancer. In some embodiments, the antagonist is an antibody that specifically binds to a Notch receptor. In other embodiments, the antagonist is an antibody that specifically recognizes an epitope of a Notch receptor. For example, the invention provides method of inhibiting growth of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antagonist of human Notch2 and/or Notch3. In some embodiments, the antagonist is an antibody that binds to Notch2. In some embodiments, the antagonist is an antibody that binds to Notch3. In some embodiments, the antagonist is an antibody that binds to Notch2 and Notch3. In some embodiments, the antagonist is an antibody or polypeptide as described in any one of the aforementioned aspects or embodiments, as well as any other aspects or embodiments described herein. In certain

embodiments, the tumor comprises an inactivating deletion or mutation in the phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene.

[00264] The invention further provides methods of inhibiting Notch signaling (e.g., Notch2 and/or Notch3) in a cell, comprising contacting the cell with an effective amount of the Notch antagonist. These methods may be *in vivo* or *in vitro*. In some embodiments, the Notch antagonist is an antibody. In some embodiments, the methods comprise inhibiting Notch2 signaling in a cell comprising contacting the cell with an effective amount of any one of the antibodies or polypeptides of the aforementioned aspects or embodiments, as well as any other aspects or embodiments described herein. In some embodiments, the Notch antagonist is an antibody. In some embodiments, the methods comprise inhibiting Notch3 signaling in a cell comprising contacting the cell with an effective amount of any of the antibodies or polypeptides of the aforementioned aspects or embodiments, as well as any other aspects or embodiments described herein.

[00265] The invention further provides a method of modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells, comprising administering an effective amount of an antagonist of human Notch3 to the subject. In some embodiments, the method inhibits angiogenesis by modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells. In some embodiments, the antagonist is an antibody or polypeptide as described in any of the aforementioned aspects or embodiments, as well as any other aspects or embodiments described herein. In certain embodiments, the vascular development that is inhibited is aberrant vascular development. In certain embodiments, the vascular development that is inhibited is in a tumor. In certain embodiments, the method further comprises administering to the subject an antagonist of VEGF or of a VEGF receptor.

[00266] In addition, the invention provides methods of inhibiting angiogenesis or vascular development in a subject, comprising administering an effective amount of a Notch antagonist to the subject. In certain embodiments, the Notch antagonist is a Notch3 antagonist. In certain embodiments, the Notch antagonist is a Notch2 antagonist. In certain embodiments, the antagonist is an antagonist of Notch2 and/or 3. In some embodiments, the antagonist is an anti-Notch2/3 antibody. In some embodiments, the methods of inhibiting angiogenesis comprises administering an antibody or polypeptide of any of the aforementioned aspects or embodiments, as well as any other embodiments or aspects described herein. In certain embodiments, the angiogenesis is tumor angiogenesis. In certain embodiments, the vascular development is at the site of a tumor. In certain alternative embodiments, the angiogenesis is not tumor angiogenesis. In certain embodiments, the inhibition of angiogenesis or vascular development is due, at least in part, to modulation of the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells. In certain embodiments, the method further comprises administering to the subject an antagonist of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) or of a VEGF receptor.

[00267] Methods of reducing the tumorigenicity of a tumor (e.g., a tumor that comprises cancer stem cells) are also provided. In certain embodiments, the methods comprise administering to a subject in need thereof (e.g., subject has a tumor) a therapeutically effective amount of the Notch antagonist. In certain embodiments, the Notch antagonist is an antibody that binds Notch2. In certain embodiments, the Notch antagonist is an antibody that binds Notch3. In certain embodiments, the Notch antagonist is an antibody that binds Notch2 and Notch3. In certain embodiments, the Notch antagonist is an antibody or polypeptide of any of the aforementioned aspects or embodiments, as well as any other embodiments or aspects described elsewhere herein. In certain embodiments, the frequency of cancer stem cells in the tumor is reduced by administration of the antibody. In some embodiments, the tumor is a colorectal tumor, breast tumor, pancreatic tumor or melanoma.

[00268] It is further envisioned that the agents and antagonists of the present invention can be used to treat various conditions characterized by expression of and/or increased responsiveness of cells to a Notch receptor. The invention provides methods of treating proliferative disease, such as cancer, diseases associated with angiogenesis (e.g., angiogenesis-dependent diseases), and diseases in which the upregulation or deregulation of Notch signaling plays a role.

[00269] In certain embodiments the disease to be treated with the Notch-binding agents or antagonists is a Notch-related disease. In certain embodiments, the disease is characterized by upregulation or deregulation of Notch signaling (e.g., Notch2 and/or Notch3 signaling). In certain embodiments, the disease or tumor is Notch2 and/or Notch3-dependent.

[00270] Particularly, it is envisioned that the antagonists (e.g., antibodies) against a Notch receptor will be used to treat proliferative disorders including, but not limited to, benign and malignant tumors of the kidney, liver, bladder, breast, stomach, ovary, colon, rectum, prostate, lung, vulva, thyroid, head and neck, brain (glioblastoma, astrocytoma, medulloblastoma, etc.), blood and lymph (leukemias and lymphomas). In certain embodiments, the proliferative disorder that Notch-binding agent or antagonist is used to treat is colorectal cancer, breast cancer, pancreatic cancer, or melanoma. In certain embodiments, the cancer comprises cancer stem cells.

[00271] In certain embodiments, the tumors treated are solid tumors. Examples of solid tumors that can be treated using a therapeutic composition of the instant invention, for example, an antibody that binds Notch include, but are not limited to, sarcomas and carcinomas such as fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma,

choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilms' tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, and retinoblastoma. The invention is applicable to sarcomas and epithelial cancers, such as ovarian cancers and breast cancers. In certain embodiments, the tumor is a colorectal tumor, breast tumor, pancreatic tumor, or melanoma. In certain embodiments, the tumor is an ovarian tumor. In certain embodiments, the tumor is a medulloblastoma. In certain embodiments, the tumor comprises cancer stem cells.

[00272] In certain embodiments, the disease to be treated with the Notch-binding agent or antagonist is a disease associated with angiogenesis. In certain embodiments, the disease is cancer. In certain other embodiments, the disease is not a cancerous condition. For example, the disease may be wet macular degeneration, age related macular degeneration, diabetic retinopathy, a hemangioma, rheumatoid arthritis, psoriasis, neovascular glaucoma, polycystic ovary disease, endometriosis and inflammatory bowel disorders.

[00273] In certain embodiments, the tumor expresses the Notch receptor or receptors to which the Notch-binding agent or antagonist is targeted. In certain embodiments, the tumor expresses Notch2 and/or Notch3. In certain embodiments, the tumor overexpresses Notch2 and/or Notch3. In certain embodiments, the tumor is dependent upon one or more Notch receptors to which the antibody administered specifically binds. For example, in certain embodiments, an antibody that specifically binds Notch2 (or Notch2 and Notch3) may be used to inhibit the growth or otherwise target the Notch2-dependent tumor. In certain embodiments, an antibody that specifically binds Notch3 (or Notch2 and Notch3) may be used to inhibit the growth or otherwise target the Notch3-dependent tumor. In certain embodiments, the tumor comprises cancer stem cells.

[00274] In certain embodiments, the tumor is homozygotic or heterozygotic for an inactivating deletion or mutation in the gene encoding the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN). In certain embodiments, the tumor comprising the deletion or mutation is a breast tumor.

[00275] The antagonists are administered as an appropriate pharmaceutical composition to a human patient according with known methods. Suitable methods of administration include intravenous administration as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intravenous, intratumoral, intraarterial, intracerobrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes.

[00276] In certain embodiments, in addition to administering a Notch antagonist, the method or treatment further comprises administering a second therapeutic agent (prior to, concurrently with, and/or subsequently to administration of the Notch antagonist). In certain embodiments, the second therapeutic

agent is an anti-cancer and/or anti-angiogenic agent. Pharmaceutical compositions comprising the Notch antagonist and the second therapeutic agent are also provided.

[00277] It will be appreciated that the combination of a Notch antagonist (e.g., antibody) and a second therapeutic agent may be administered in any order or concurrently. In selected embodiments, the Notch antagonists will be administered to patients that have previously undergone treatment with the second anti-cancer agent. In certain other embodiments, the Notch antagonist and the second therapeutic agent will be administered substantially simultaneously or concurrently. For example, a subject may be given the Notch antagonist while undergoing a course of treatment with the second therapeutic agent (e.g., chemotherapy). In certain embodiments, the Notch antagonist will be administered within 1 year of the treatment with the second therapeutic agent. In certain alternative embodiments, the Notch antagonist will be administered within 10, 8, 6, 4, or 2 months of any treatment with the second therapeutic agent. In certain other embodiments, the Notch antagonist will be administered within 4, 3, 2, or 1 week of any treatment with the second therapeutic agent. In some embodiments, the Notch antagonist will be administered within 5, 4, 3, 2, or 1 days of any treatment with the second therapeutic agent. It will further be appreciated that the two agents or treatment may be administered to the subject within a matter of hours or minutes (i.e., substantially simultaneously).

[00278] Useful classes of anti-cancer agents include, for example, antitubulin agents, auristatins, DNA minor groove binders, DNA replication inhibitors, alkylating agents (e.g., platinum complexes such as cisplatin, mono(platinum), bis(platinum) and tri-nuclear platinum complexes and carboplatin), anthracyclines, antibiotics, antifolates, antimetabolites, chemotherapy sensitizers, duocarmycins, etoposides, fluorinated pyrimidines, ionophores, lexitropsins, nitrosoureas, platinols, performing compounds, purine antimetabolites, puromycins, radiation sensitizers, steroids, taxanes, topoisomerase inhibitors, vinca alkaloids, or the like. In certain embodiments, the second anti-cancer agent is an antimetabolite, a topoisomerase inhibitor, or an angiogenesis inhibitor.

[00279] Anticancer agents that may be administered in combination with the Notch antagonists include chemotherapeutic agents. Thus, in some embodiments, the treatment involves the combined administration of an antagonist of the present invention and a chemotherapeutic agent or cocktail of multiple different chemotherapeutic agents. Treatment with an antagonist can occur prior to, concurrently with, or subsequent to administration of chemotherapies. Chemotherapies contemplated by the invention include chemical substances or drugs which are known in the art and are commercially available, such as doxorubicin, 5-fluorouracil, cytosine arabinoside (Ara-C), cyclophosphamide, thiotepa, busulfan, cytoxin, taxol, methotrexate, cisplatin, melphalan, vinblastine and carboplatin. Combined administration can include co-administration, either in a single pharmaceutical formulation or using separate formulations, or consecutive administration in either order but generally within a time period such that all active agents can exert their biological activities simultaneously. Preparation and dosing schedules for such

chemotherapeutic agents can be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

[00280] Chemotherapeutic agents useful in the instant invention also include, but are not limited to, alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide (CYTOXAN); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphaoramide and trimethylolomelamime; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabicin, caminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elformithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK.; razoxane; sizofuran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside (Ara-C); cyclophosphamide; thiotepa; taxoids such as paclitaxel (TAXOL) and doxetaxel (TAXOTERE, Rhone); chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Chemotherapeutic agents also include anti-hormonal agents that act to regulate or

inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston); and antiandrogens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

[00281] In certain embodiments, the chemotherapeutic agent is a topoisomerase inhibitor. Topoisomerase inhibitors are chemotherapy agents that interfere with the action of a topoisomerase enzyme (e.g., topoisomerase I or II). Topoisomerase inhibitors include, but are not limited to, doxorubicin HCL, daunorubicin citrate, mitoxantrone HCL, actinomycin D, etoposide, topotecan HCL, teniposide (VM-26), and irinotecan. In certain embodiments, the second anticancer agent is irinotecan. In certain embodiments, the tumor to be treated is a colorectal tumor and the second anticancer agent is a topoisomerase inhibitor, such as irinotecan.

[00282] In certain embodiments, the chemotherapeutic agent is an anti-metabolite. An anti-metabolite is a chemical with a structure that is similar to a metabolite required for normal biochemical reactions, yet different enough to interfere with one or more normal functions of cells, such as cell division. Anti-metabolites include, but are not limited to, gemcitabine, fluorouracil, capecitabine, methotrexate sodium, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, cytosine arabinoside, thioguanine, 5-azacytidine, 6-mercaptopurine, azathioprine, 6-thioguanine, pentostatin, fludarabine phosphate, and cladribine, as well as pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives of any of these. In certain embodiments, the second anticancer agent is gemcitabine. In certain embodiments, the tumor to be treated is a pancreatic tumor and the second anticancer agent is an anti-metabolite (e.g., gemcitabine).

[00283] In other embodiments, the treatment involves the combined administration of an antagonist of the present invention and radiation therapy. Treatment with an antagonist can occur prior to, concurrently with, or subsequent to administration of radiation therapy. Any dosing schedules for such radiation therapy can be used.

[00284] In other embodiments, the treatment can involve the combined administration of antibodies of the present invention with other antibodies against additional tumor associated antigens including, but not limited to, antibodies that bind to the EGF receptor (EGFR) (e.g., Erbitux®), the erbB2 receptor (HER2) (e.g., Herceptin®), and vascular endothelial growth factor (VEGF) (e.g., Avastin®). In certain alternative embodiments, the second anti-cancer agent comprises an antibody that specifically binds to human DLL4 or other ligand of a Notch receptor or an antibody that specifically binds to an additional human Notch receptor. Exemplary, anti-DLL4 antibodies, are described, for example, in U.S. Patent Application Publication No. US 2008/0187532, incorporated by reference herein in its entirety. Additional anti-DLL4 antibodies are described in, e.g., International Patent Publication Nos. WO 2008/091222 and WO 2008/0793326, and U.S. Patent Application Publication Nos. US 2008/0014196, US 2008/0175847; US 2008/0181899; and US 2008/0107648, each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

Exemplary anti-Notch antibodies, are described, for example, in U.S. Patent Application Publication No. US 2008/0131434, incorporated by reference herein in its entirety. In certain embodiments, the second anti-cancer agent is an inhibitor of Notch signaling. In certain embodiments, the second anti-cancer agent is an antibody that is an angiogenesis inhibitor (e.g., an anti-VEGF antibody). In certain embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that specifically binds a VEGF receptor. In certain embodiments, the second therapeutic agent is AVASTIN (bevacizumab), HERCEPTIN (trastuzumab), VECTIBIX (panitumumab), or ERBITUX (cetuximab). Combined administration can include co-administration, either in a single pharmaceutical formulation or using separate formulations, or consecutive administration in either order but generally within a time period such that all active agents can exert their biological activities simultaneously.

[00285] Furthermore, treatment can include administration of one or more cytokines (e.g., lymphokines, interleukins, tumor necrosis factors, and/or growth factors) or can be accompanied by surgical removal of cancer cells or any other therapy deemed necessary by a treating physician.

[00286] For the treatment of the disease, the appropriate dosage of an antagonist of the present invention depends on the type of disease to be treated, the severity and course of the disease, the responsiveness of the disease, whether the antagonist is administered for therapeutic or preventative purposes, previous therapy, patient's clinical history, and so on, all at the discretion of the treating physician. The antagonist can be administered one time or over a series of treatments lasting from several days to several months, or until a cure is effected or a diminution of the disease state is achieved (e.g., reduction in tumor size). Optimal dosing schedules can be calculated from measurements of drug accumulation in the body of the patient and will vary depending on the relative potency of an individual antagonist. The administering physician can easily determine optimum dosages, dosing methodologies and repetition rates. In general, dosage is from 0.01 μg to 100 mg per kg of body weight, and can be given once or more daily, weekly, monthly or yearly. The treating physician can estimate repetition rates for dosing based on measured residence times and concentrations of the drug in bodily fluids or tissues.

[00287] In certain embodiments, the patients under consideration for treatment with the Notch antagonist are screened prior to treatment with the Notch antagonist. In certain embodiments, a tumor in a patient or a tumor that has been removed from a patient is tested for the presence of cancer stem cells. In certain embodiments, the tumor is tested for expression of the one or more Notch receptors (e.g., Notch2 and/or Notch3) to which the antagonist binds. In certain embodiments, the tumor is tested for the presence of an inactivating deletion or mutation in the gene encoding the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN). In certain embodiments, the tumor so tested is a breast tumor.

[00288] For example, the invention provides a method of selecting a subject for treatment with a Notch2 and/or Notch 3 antagonist, wherein the subject has a tumor or has had a tumor removed. In certain embodiments, the method comprises (a) determining if the tumor comprises a deletion or mutation in the

PTEN gene, and (b) selecting the subject for treatment with the Notch 3 antagonist if the tumor comprises the deletion or mutation.

[00289] In certain alternative embodiments of the present invention, patients screened for the presence of colon adenomas or polyps are tested for allelic loss and somatic mutations via a genetic test. In some embodiments the genetic test screens for loss or mutations in the Wnt pathway including, for example, in APC, Axin2 or beta-catenin.

[00290] In another aspect, the present invention provides kits that can be used to perform the methods described herein. In some embodiments, a kit comprises an antibody or antibodies specific for a Notch receptor, a purified antibody or antibodies, in one or more containers. In some embodiments, a kit further comprises a substantially isolated Notch receptor comprising an epitope that is specifically immunoreactive with the antibody or antibodies included in the kit, a control antibody that does not react with the Notch receptor, and/or a means for detecting the binding of an antibody to a Notch receptor (such as, for example, a fluorescent chromophore, an enzymatic substrate, a radioactive compound or a luminescent compound conjugated to the antibody against a Notch receptor or to a second antibody that recognizes the antibody against a Notch receptor). In other embodiments, a kit comprises reagents specific for the detection of mRNA or cDNA (e.g., oligonucleotide probes or primers) of one or more Notch receptor. In some embodiments, the kits contain all of the components necessary and/or sufficient to perform a detection assay, including all controls, directions for performing assays, and any necessary software for analysis and presentation of results.

[00291] A compartment kit includes any kit in which reagents are contained in separate containers. Such containers include small glass containers, plastic containers or strips of plastic or paper. Such containers allows one to efficiently transfer reagents from one compartment to another compartment such that the samples and reagents are not cross-contaminated, and the agents or solutions of each container can be added in a quantitative fashion from one compartment to another. Such containers will include a container which will accept the test sample, a container which contains the antibodies or probes used in the methods, containers which contain wash reagents (such as phosphate buffered saline, Tris-buffers, etc.), and containers which contain the reagents used to detect the bound antibody or probe. One will readily recognize that the disclosed polynucleotides, polypeptides and antibodies of the present invention can be readily incorporated into one of the established kit formats which are well known in the art.

[00292] In some embodiments, the invention further provides a kit comprising a Notch-binding agent or antagonist and a second therapeutic agent. In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist is an antibody that specifically binds to Notch 2 and/or Notch3. In certain embodiments, the Notch-binding agent or antagonist is an antibody that specifically binds to Notch 2 and Notch3. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an anti-cancer agent and/or an anti-angiogenic agent.

[00293] In one aspect, the present invention provides a method of identifying a molecule that binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor and inhibits tumor growth, the method comprising: i) incubating the molecule with the non-ligand binding domain of the extracellular domain of the human Notch receptor; ii) determining if the molecule binds to the non-ligand binding region of the extracellular domain of the human Notch receptor; and iii) determining if the molecule inhibits tumor growth. Molecules that specifically bind a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor include, but are not limited to, small organic molecules, polypeptides, and antibodies.

[00294] Screening can be performed using any suitable method known in the art. In certain embodiments, screening is performed *in vitro*. In some embodiments, cells expressing a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor are incubated with a labeled molecule and specific binding of the labeled molecule to a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor is determined by FACS analysis. In some embodiments, a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor is expressed by phage display, and molecules that specifically bind to a non-binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor are identified. Other suitable methods for identifying molecules that specifically bind to a non-ligand binding region of a human Notch receptor include, but are not limited to, ELISA, Western (or immuno) blotting, and yeast-two-hybrid.

[00295] Molecules that specifically bind to a non-ligand binding region of an extracellular domain of a human Notch receptor are then tested for inhibition of tumor cell growth. Testing can be performed using any suitable method known in the art. In certain embodiments, molecules that specifically bind to non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor are tested for the ability to inhibit tumor growth *in vitro*. In some embodiments, molecules that specifically bind a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor are incubated with tumor cells in culture and proliferation of tumor cells in the presence of a molecule that specifically binds a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor is determined and compared to tumor cells incubated with a non-binding control molecule. In certain embodiments, molecules that specifically bind to non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor are tested for the ability to inhibit tumor growth *in vivo*. In certain embodiments, molecules that specifically bind a non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor are injected into an animal xenograft model and the growth of tumors in animals treated with molecules that specifically bind to non-ligand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor is determined and compared to animals treated with a non-binding control molecule.

EXAMPLES

[00296] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application.

Example 1

Production of human antibodies to Notch2

[00297] Human antibodies that specifically recognize the non-ligand binding portion of the extracellular domain of a Notch2 receptor were isolated using phage display technology. A synthetic antibody library containing human antibody variable domains was screened for specific and high affinity recognition of a Notch2 receptor.

[00298] Briefly, $2x10^{13}$ Fab displaying phage particles were incubated with a passively immobilized, recombinant Notch2 Fc fusion protein (SEQ ID NO:21) comprising the extracellular ligand binding site of Notch2 and surrounding EGF repeats (EGF1-12) in round one. The non-specific phage were washed off, and then the specific phage were eluted with DTT. The eluted output was used to infect TG1 F+ bacteria, rescued with helper phage, and then Fab display induced with IPTG (0.25 mM). This process was repeated for two additional rounds and then round three was screened in ELISA against passively immobilized recombinant Notch2 (EGF1-12) Fc fusion (5 μg/ml).

[00299] A particular Fab (59R1) was identified that bound the human Notch2 receptor and blocked binding of Jagged1 to human Notch2. Binding of the 59R1 Fab to human Notch2 was verified by FACS assay using a stable human cell line HEK-293 which overexpressed human Notch2 (hN2) (Figure 1A). Fab binding was detected by phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-human Fab (Jackson Immunochemicals). The 59R1 Fab (referred to in Figure 1A as clone 1) demonstrated good binding to hN2. The 59R1 Fab also demonstrated good blocking activity against the Notch ligand human Jagged1 in a binding assay using the same stable cell line (Figure 1B). Ligand binding and blocking was determined by incubating hJagged1 extracellular domain (ECD) fused to human Fc constant region with the cells and Fabs selected from the phage library and using PE-conjugated goat anti-human Fc gamma specific antibodies (Jackson Immunochemicals) for detection.

[00300] The sequences of the VH and VL of the 59R1 Fab are provided in SEQ ID NO: 11 and SEQ ID NO: 12 (including N-terminus bacterial signal sequences that are cleaved upon secretion), respectively. The CDRs of the 59R1 Fab are as indicated in Table 2 below.

Table 2. CDRs of 59R1 human Fab and IgG antibodies

Lead	Heavy Chain			Light Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
59R1	SSSGMS (SEQ ID NO:5)	VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)	GIFFAI (SEQ ID NO:7	RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)	GASSRAT (SEQ ID NO:9	QQYSNFPI (SEQ ID NO:10)

[00301] Variable regions based on those of the 59R1 Fab were cloned into Ig expression vectors containing human IgG2 heavy-chain and kappa light-chain along with their respective mammalian signal sequences for expression in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. The VH and VL of the 59R1 IgG antibody are provided as SEQ ID NO: 13 and SEQ ID NO: 14, respectively. The amino acid sequence of the heavy chain and light chain of the 59R1 IgG antibody (including signal sequences) are provided as SEQ ID NO: 16 and SEQ ID NO: 18, respectively. The signal sequence at the N-terminus of the amino acid sequence of each of the chains is cleaved upon secretion. The nucleic acid sequences encoding the heavy and light chains of the 59R1 IgG antibody are provided as SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 3, respectively. Protein A purification was used to purify the antibodies. Bacterial plasmid DNA containing a synthetic DNA insert encoding the heavy and light chain of the 59R1 IgG2 antibody DNA was deposited as "59R1" with the ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, under the conditions of the Budapest Treaty on October 15, 2008, and assigned designation number PTA-9547.

[00302] In addition, the 59R1 IgG2 antibody was assayed for its ability to block binding of DLL4 to the human Notch 2 receptor by FACS analysis. HEK-293 cells stably overexpressing human Notch2 were incubated with the antibody at various concentration and then detected for hNotch2 binding (Figure 1C) by PE-conjugated goat anti-human Fc gamma specific antibody, or ligand blocking activity (Figure 1D). Ligand blocking was determined by incubating the cells with human DLL4 ECD tagged with the rabbit Fc constant region and the 59R1 antibody at a range of concentrations, and then detecting the hDLL4 by PE-conjugated donkey anti-rabbit antibody. Binding of hNotch2 and ligand blocking activity were thus confirmed for the 59R1 IgG2 antibody.

[00303] A germlined variant of 59R1 (referred to herein as "59RGV") was also expressed and purified. The VH and VL of the 59RGV antibody are provided as SEQ ID NO: 19 and SEQ ID NO: 20, respectively. The amino acid sequence of the heavy chain and light chain of the 59RGV antibody (including signal sequences) are provided as SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 4, respectively. The signal sequence at the N-terminus of the amino acid sequence of each of the chains is cleaved upon secretion. The nucleic acid sequences encoding the heavy and light chains of the 59RGV antibody are provided as SEQ ID NO: 15 and SEQ ID NO: 17, respectively.

[00304] Highly hydrophobic CDRs have the potential, in certain instances, to allow for unfavorable, non-specific binding by an antibody. Since the amino acid sequence of the heavy

chain CDR3 of 59R1 had an unusual degree of hydrophobic character, variants of 59R1 that contained heavy chain CDR3 sequences with decreased hydrophobic character were produced. Heavy chain CDR3 affinity maturation was conducted by allowing restricted changes from the parental sequence (GIFFAI; SEQ ID NO:7) as shown in Figure 1E. Allowed amino acids at each position were allowed to change from parental residues to the residues indicated in Figure 1E. Improved variants were isolated by screening them for improved JAG1 blocking ability as shown in Figure 1F (indicated with arrows). Briefly, Fabs (1 and 10 μg/ml) were mixed with hJAG1-rb Fc (preclustered 5 μg/ml to 2μl/ml PE-conjugated donkey anti-rabbit) and then added to hNotch2 stably transfected 293 cells. hJAG1 binding was then assessed using flow cytometry. Six improved variants (versus 59R1 Fab) were isolated and their HC CDR3 sequences were as follows: SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26), and SSFFAN (SEQ ID NO:27). The sequences of the heavy chain variable regions for these variants are sequences SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, and SEQ ID NO:57.

Example 2

Cross-reactivity and binding affinity of anti-Notch2/3 59R1 antibody

[00305] The ability of the 59R1 IgG2 antibody to cross-react with other Notch receptors was determined by FACS assay using HEK-293 cells transiently transfected with the human Notch1, Notch2, Notch3 or Notch4 expression plasmid and green fluorescent protein (GFP) as a transfection control. GFP positive cells indicated expression of the transgene. The 59R1 IgG2 was added to the cells at 2 μg/ml and detected by PE-conjugated goat anti-human Fc gamma specific (Jackson Immunochemicals). All Notch constructs were full length. The results are shown in Figure 2. As shown in Figure 2, the 59R1 IgG2 antibody specifically binds to both human Notch3 and human Notch2, but does not bind significantly to full-length human Notch1 or human Notch4.

[00306] The affinities for human and mouse Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4 were determined using a Biacore 2000 instrument. Briefly, recombinant human and mouse Notch proteins (EGF10-15 for Notch1, 2, & 4; EGF9-14 for Notch3) were immobilized on a CM5 chip using standard amine based chemistry (NHS/EDC). For hNotch2, EGF1-12 was also tested for binding. Different antibody concentrations (1 – 100 nM) were injected over the protein surfaces and kinetic data were collected over time. The data was fit using the simultaneous global fit equation to yield dissociation constants (K_D, nM) for each Notch (Table 3).

Table 3

59R1 IgG Dissociation Constants (K_D)								
Ab	mNotch1 (nM)	hNotch1 (nM)	mNotch2 (nM)	hNotch2 (nM)*	hNotch2 (nM)**	mNotch3 (nM)	hNotch3 (nM)	hNotch4 (nM)
59R1	>10	86.4	0.35	<0.1	<0.1	0.13	0.12	NB

*N2(EGF1-12)

**N2(EGF 10-155)

Example 3

Epitope mapping of anti-Notch2/3 antibody 59R1

[00307] To identify antibodies that recognize specific non-ligand binding regions of the Notch receptor extracellular domains, epitope mapping was performed.

[00308] The binding of anti-Notch2/3 antibodies to supernatant from HEK 293 cells transfected with sequences encoding recombinant human Notch2 Fc fusion proteins comprising the full length human Notch2 protein or various human Notch2 deletion constructs containing various deletions of EGF repeats one to twelve were tested by ELISA. See Table 4 below. HEK-293 cells were transiently transfected with pcDNA 3.1 (Invitrogen) with hNotch2 cDNA's encoding for the indicated amino acids fused to the constant region of human IgG (hFc). Supernatants were harvested 48 hours later. To capture hN2–hfc proteins, 96 well plates were first coated with goat anti-human Fc gamma specific IgG (Jackson Immunochemicals, #109-006-098) at 100 ng per well in sodium bicarbonate buffer overnight at 4°. Plates were washed and blocked in 5% bovine serum/PBS-Tween-20. Supernatants were added to plates and incubated at room temperature for 1 hour. Plates were washed in PBS-T. 59R1 Fab was added at 10 µg/ml in 5% serum/PBS-T and incubated at room temperature for 1 hour. Plates were washed in PBS-T. Fab binding was detected by goat anti-human Fab specific antibody conjugated to horseradish peroxidase (Thermo, # 31414) diluted 1:5000 in 5% serum/PBS-T for 1 hour at room temperature. Plates were washed and developed with 1 Step Ultra TMB (Thermo, # 34028). Plates were read on a Perkin Elmer Victor 1420 plate reader. Anti-Notch2/3 59R1 antibody bound only to supernatant from cells expressing recombinant Notch2 proteins comprising EGF10, which consists of amino acids 375-417 of human Notch 2. (Figure 3A).

Table 4. Human Notch2 deletion constructs

Construct	amino acids
hN2 1-3	1-144
hN2 1-4	1-181
hN2 1-5	1-221
hN2 1-6	1-263
hN2 1-7	1-301
hN2 1-8	1-341
hN2 1-9	1-378
hN2 1-10	1-417
hN2 1-11	1-456
hN2 1-12	1-493
hN2 8-12	296-493
hN2 9-12	326-493
hN2 10-12	375-493
hN2 11-12	413-493
hN2 12-12	454-493

[00309] Moreover, FACS analysis shows that 59R1 Fab antibody binding was retained when EGF11 or EGF12 were deleted from full length Notch2 recombinant protein expressed by HEK 293 cells (Figure 3B). Point mutations were made within EGF10 of Notch2 fusion proteins and binding of 59R1 to each EGF10 mutant was determined by FACS analysis. HEK-293 cells were transiently transfected with the indicated Notch expression plasmid and GFP as a transfection control. GFP positive cells indicated expression of the transgene. The 59R1 Fab antibody was added to the cells at 10 μg/ml and detected by PE-conjugated goat anti-human (Jackson Immunochemicals).

[00310] To verify that loss of EGF repeat 10 does not interfere with ligand binding, a mutant hNotch2 missing amino acids 375-412 was generated and tested for binding to 59R1, a hNotch2 monoclonal 59M70 directed against EGF 1-4, and binding to the ligand human DLL4 (Figure 3C). FACS analysis of HEK-293 cells transiently transfected with the indicated Notch expression plasmid and GFP as a transfection control. GFP positive cells indicate expression of the transgene. Anti-Notch2 (59M70) was added at 20 μg/ml and detected by PE-conjugated goat anti-mouse (Caltag, #3004-4). 59R1 (IgG2) was added to the cells at 2 μg/ml and detected by PE-conjugated goat anti-human Fc gamma specific (Jackson Immunochemicals). Ligand binding was determined by incubation of the cells with human DLL4 extracellular domain (ECD) fused to rabbit IgG constant region at 5 μg/ml and detected by PE-conjugated donkey anti-rabbit. As shown in Figure 3C, ligand and 59M70 both bind to hNotch2 in the absence of EGF 10, but 59R1 does not.

[00311] A comparison analysis of the EGF 10 regions of human Notch1, Notch2, and Notch4 and the EGF 9 region of human Notch3 (the equivalent of EGF 10 in the other Notch receptors) was performed to determine likely binding sites for 59R1 (Figure 14A). As a result of the analysis, several point mutants were created within full-length Notch2, converting residues within EGF10 to the corresponding amino acids in human Notch 1. Also, conversely, point mutations were made in hNotch1 EGF 10 converting

residues to the corresponding hN2 residues. Mutants in full-length Notch sequences were generated by QuikChange® mutagenesis (Stratagene) and verified by sequencing. Binding to the mutants was determined by FACS analysis (Figure 14B and 14C). 59R1 was detected by PE-conjugated goat anti-human Fc gamma specific antibody (Jackson Immunochemicals, #109-116-170). The amino acids necessary for 59R1 binding to hNotch 2 were thus determined to be histidine 385, alanine 388, and leucine 389 (residues within the boxed hNotch2 sequence shown in Figure 14A). The corresponding residues in hNotch3 are histidine 361, alanine 364, and isoleucine 365.

Example 4

Anti-Notch2/3 antibody 59R1 inhibits Notch2 signaling

[00312] Luciferase reporter assays were used to assay the 59R1 antibody for its ability to block hDLL4-, hJAG1-, and hJAG2-induced Notch2 signaling.

[00313] Hela cells that stably overexpress human Notch2 were transiently transfected with firefly luciferase with a synthetic 8X CBS promoter (Ong et al., 2006, *J. of Biological Chemistry*, 281:5106-5119), pSPORT6 MAML-1, and Renilla luciferase-CMV as a transfection control. Cells were incubated with 100 ng of immobilized hDLL4 (R&D systems) with the indicated antibodies for 16 hours and then assayed using Dual-Glo (Promega) according to the manufacturer's instructions. Control antibody was at a concentration of 40 μg/ml. 59R1 IgG2 antibody was titrated, starting at 40 μg/ml, and then diluted by one-fourth. The gamma secretase inhibitor (GSI) dibenzazepine (DBZ) was used as a control at 1 μM. As shown in Figure 4A, the 59R1 antibody was found to inhibit hDLL4-induced Notch2 reporter activity.

[00314] Hela cells that stably overexpress human Notch2 were transiently transfected with firefly luciferase with a synthetic 8X CBS promoter, pSPORT6 MAML-1, and Renilla luciferase-CMV as a transfection control. Cells were incubated with either 200 ng of immobilized hJAG1 (R&D systems) or hJAG2 (R&D systems) for 16 hours and then assayed using Dual-Glo (Promega) according to the manufacturer's instructions. 59R1 IgG2 antibody was at a concentration of 40 μg/ml. The gamma secretase inhibitor (GSI) dibenzazepine (DBZ) was used as a control at 1 μM. As shown in Figures 4B and 4C, the 59R1 antibody was found to inhibit both hJAG1- and hJAG2-induced Notch2 reporter activity, respectively.

Example 5

Anti-Notch2/3 antibody 59R1 prevents *in vivo* tumor growth

[00315] This example describes the use of an anti-Notch2/3 receptor antibody (59R1) that binds a non-ligand binding region of the Notch receptors (EGF10 of Notch2 and EGF10 of Notch3) to prevent tumor growth in a xenograft model.

[00316] In certain embodiments, NOD/SCID mice injected with 50,000 PE13 or T3 breast tumor cells were treated with anti-Notch2/3 antibody 59R1 or control antibody 1B7.11 two days following cell injections. Antibodies were dosed at 10 mg/kg twice week. Anti-Notch2/3 antibody 59R1 significantly reduced both PE13 (Figure 5A) and T3 (Figure 5B) tumor growth compared to control.

Example 6

In vivo treatment of tumors using anti-Notch 2/3 antibody 59R1

[00317] This example describes the use of anti-Notch 2/3 antibodies to treat cancer in a xenograft model.

[00318] In one experiment, the $1x10^7$ viable Colo-205 colon tumor cells were injected into 6-8 week-old immunodeficient *bg/nu XID* female mice on a Swiss CD-1 background. Tumors were allowed to grow to a size of between 65 to 200 mm^3 after which mice were randomized (n=10 per experimental group), and antibodies administration begun. Animals were treated with 15 mg/kg of either control 1B7.11 antibodies or anti-Notch2/3 59R1 antibodies once weekly. Tumor size was measured twice weekly, and tumor volume was calculated as described (*see* Michieli et al., 2004, *Cancer Cell*, 6:61-73). Anti-Notch2/3 antibody 59R1 significantly reduced Colo-205 tumor growth compared to control (Figure 5C).

[00319] In another experiment, anti-Notch2/3 antibodies were tested for an effect on pancreatic tumor growth. NOD/SCID mice were injected with 30,000 PN4 pancreatic tumor cells sub-cu in the right flank, and tumors were allowed to grow until they had reached an average volume of 100 mm^3. Animals were randomized and dosing of anti-Notch2/3 antibody 59R1 or control antibody 1B711 was initiated. Antibodies were dosed at 15 mg/kg given once per week. Anti-Notch2/3 antibody 59R1 significantly reduced PN4 tumor growth compared to control (Figure 5D).

[00320] In a further experiment, anti-Notch2/3 antibodies were tested for an effect on breast tumor growth. NOD/SCID mice were injected with 50,000 PE13 or T3 breast tumor cells, and tumors were allowed to grow to a size of between 65 to 200 mm^3 after which mice were randomized (n=10 per experimental group), and antibodies administration begun. Animals were treated with 15 mg/kg of either control 1B7.11 antibodies or anti-Notch2/3 59R1 antibodies twice weekly. Tumor size was measured twice weekly, and tumor volume was calculated as described (*see* Michieli et al., 2004). Anti-Notch2/3 antibody 59R1 significantly reduced growth of both PE13 (Figure 5E) and TE (Figure 5F) tumors compared to control.

[00321] At the end point of antibody treatment, tumors may be harvested for further analysis. In some embodiments, a portion of the tumor is analyzed by immunofluorescence to assess antibody penetration into the tumor and tumor response. A portion of each harvested tumor from anti-Notch2/3 antibody treated and control antibody treated mice is fresh-frozen in liquid nitrogen, embedded in O.C.T., and cut on a cryostat as 10 μm sections onto glass slides. Alternatively a portion of each tumor is formalin-fixed,

paraffin-embedded, and cut on a microtome as 10 μm section onto glass slides. Sections are post-fixed and incubated with chromophore labeled antibodies that specifically recognize injected antibodies to detect anti-Notch2/3 antibody or control antibodies present in the tumor biopsy. Furthermore, antibodies that detect different tumor and tumor recruited cell types such as, for example, anti-VE cadherin (CD144) or anti-PECAM-1 (CD31) antibodies to detect vascular endothelial cells, anti-smooth muscle alpha-actin antibodies detect vascular smooth muscle cells, anti-Ki67 antibodies to detect proliferating cells, TUNEL assays to detect dying cells, and anti-intracellular domain (ICD) Notch fragment antibodies to detect Notch signaling can be used to assess affects of antibody treatment on angiogenesis, tumor growth, and tumor morphology.

[00322] The effect of anti-Notch2/3 antibody treatment on tumor cell gene expression may also be assessed. Total RNA is extracted from a portion of each harvested tumor from Notch2/3 antibody treated and control antibody treated mice and used for quantitative RT-PCR. Expression levels of Notch2/3, components of the Notch2 and/or Notch3 signaling pathway, as well as cancer stem cell markers including, for example, CD44, are analyzed relative to the house-keeping gene GAPDH as an internal control. Changes in tumor cell gene expression upon Notch2/3 antibody treatment are thus determined.

[00323] In addition, the effect of anti-Notch2/3 antibody treatment on the presence of cancer stem cells in a tumor may be assessed. Tumor samples from Notch 2/3 antibody versus control antibody treated mice are cut up into small pieces, minced completely using sterile blades, and single cell suspensions obtained by enzymatic digestion and mechanical disruption. Dissociated tumor cells are then analyzed by FACS analysis for the presence of tumorigenic cancer stem cells based on ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- surface cell marker expression as described in detail above.

[00324] The tumorigenicity of cells isolated based on ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- expression following anti-Notch2/3 antibody treatment can then assessed. In one example, 5,000, 1,000, 500, and 100 isolated ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- cancer stem cells from Notch 2/3 antibody treated versus control antibody treated mice are re-injected subcutaneously into the mammary fat pads of NOD/SCID mice. The tumorigenicity of cancer stem cells based on the number of injected cells required for consistent tumor formation is thus determined.

Example 7

Anti-Notch 2/3 antibody 59R1 delays tumor recurrence *in vivo* following paclitaxel treatment

[00325] B51 breast tumor cells (50,000 cells per mouse) were injected sub-cutaneously into the mammary fat pad of NOD-SCID mice. Tumors were allowed to grow for 50 days until they had reached an average volume of ~100 mm^3. Animals were randomized (n = 10/group) and treatments were initiated. One group received a control antibody (1B711) at 10 mg/kg twice per week and paclitaxel (Taxol) at 15 mg/kg

twice per week and the other group received 59R1 at 10 mg/kg twice per week and paclitaxel at 15 mg/kg twice per week. Tumor volumes were measured on the indicated days. Treatments were carried out for 38 days until the tumor volumes had regressed to ~ 50 mm^3, after which the paclitaxel treatments were halted and the antibody treatments continued for the duration of the experiment.

[00326] The results are shown in Figure 6. Tumors were observed to recur more rapidly in the control group compared with the group treated with 59R1.

Example 8

Anti-Notch 2/3 antibody 59R1 decreases the frequency of cancer stem cells in a tumor *in vivo*

[00327] Limiting dilution assays (LDAs) can be used to assess the effect of a Notch-binding agent on solid tumor cancer stem cells and on the tumorigenicity of a tumor comprising the cancer stem cells. The assays can be sued to determine the frequency of cancer stem cells in tumors from animals treated with the Notch-binding agent or other agent and to compare that frequency to the frequency of cancer stem cells in tumors from control animals.

[00328] An LDA was used to assess the effect on the tumorigenicity of the B51 breast tumors that were treated with the combination of control antibody (1B711) plus paclitaxel (Taxol) or treated with the combination of 59R1 and paclitaxel, as described above in Example 7. In addition, the effect of treatment of B51 breast tumors with the control antibody alone or 59R1 alone was also determined by LDA. The doses of antibodies and paclitaxel and the schedule of dosing for the control antibody group and the 59R1 group were the same as described in Example 7, above for the other two treatment groups. After three doses of antibodies and/or paclitaxel, tumors were harvested, processed and dissociated into single cells. The human tumor cells were isolated from the xenograft tumor cells by incubation with biotinylated mouse antibodies (α-mouse CD45-biotin 1:200 dilution and rat α-mouse H2Kd-biotin 1:100 dilution, BioLegend, San Diego, CA) on ice for 30 min, followed by addition of streptavidin-labeled magnetic beads and removal of the mouse cells with the aid of a magnet. The human cells in the suspension were harvested and counted.

[00329] A serial titration of cells (30, 90, 270, and 810 cells) from each of the four treatment groups was injected in a 1:1 (v/v) mixture of FACS buffer and Matrigel into a new set of NOD-SCID mice (n=10/group). Tumors were allowed to grow for 72 days. The percentage of mice with detectable tumors was determined in all groups. The cancer stem cell frequency was then calculated using L-Calc™ software (StemCell Technologies Inc.; downloadable from www.stemcell.com/search/default.asp).

[00330] The results are shown in Figure 7. The frequency of cancer stem cells in the tumor in the control-treated mice ("Control") was determined to be 1:66. The frequency of cancer stem cells in the tumor in the paclitaxel-treated mice ("Taxol") was shown to be 1:25, indicating that treatment with paclitaxel had

actually increased the frequency of cancer stem cells in the tumor by more than two-fold relative to the control. Treatment with the 59R1 antibody, either alone ("59R1") or in combination with paclitaxel ("Taxol+59R1"), on the other hand, reduced the frequency of cancer stem cells in the tumors. The 59R1 antibody alone reduced the cancer stem cell frequency in the breast tumors by more than two-fold relative to the control. Treatment with the combination of 59R1 antibody and paclitaxel reduced the frequency of cancer stem cells in the tumor by more than about two-fold relative to treatment with 59R1 alone ($p<0.0001$), by about 4.5-fold relative to treatment with the control antibody, and by about twelve-fold relative to treatment with paclitaxel alone. These results indicate that treatment with the 59R1 antibody is effective at reducing the tumorigenicity of a breast tumor, whether given alone or in combination with paclitaxel, even though treatment with paclitaxel alone has the opposite effect.

Example 9

Additional *in vivo* treatment of tumors using anti-Notch 2/3 antibody 59R1

[00331] PN4 pancreatic tumor cells (50,000 cells per mouse) were injected subcutaneously into the flank region of Nod-Scid mice. Tumors were allowed to grow for 27 days until they had reached an average volume of ~120 mm^3. Animals were randomized into four treatment groups (n = 10/group) and treatments were initiated. One group received a control antibody (1B711) at 10 mg/kg twice per week; one group received gemcitabine at 40 mg/kg once per week plus the control antibody at 10 mg/kg twice per week; one group received 59R1 at 10 mg/kg twice per week, and the fourth group received the combination of 59R1 at 10 mg/kg twice per week and gemcitabine 40 mg/kg once per week. Tumor volumes were measured on the indicated days. The results are shown in Figure 8. Tumor growth was found to be inhibited by the combination of 59R1 and gemcitabine ($p < 0.001$).

[00332] M4 melanoma tumor cells (10,000 cells per mouse) were injected subcutaneously into the flank region of NOD-SCID mice. Tumors were allowed to grow for 25 days until they had reached an average volume of ~80 mm^3. Animals were randomized into treatment groups (n = 10/group) and treatments were initiated. One group received a control antibody (1B711) at 10 mg/kg twice per week and one group received 59R1 at 10 mg/kg twice per week. Tumor volumes were measured on the indicated days. The results are shown in Figure 9. Tumor growth was found to be inhibited by 59R1.

[00333] C28 colon tumor cells (10,000 cells per mouse) were injected subcutaneously into the flank region of NOD-SCID mice. Tumors were allowed to grow for 24 days until they had reached an average volume of ~130 mm^3. Animals were randomized into four treatment groups (n = 10/group) and treatments were initiated. One group received a control antibody (1B711) at 10 mg/kg twice per week; one group received irintoecan at 7.5 mg/kg once per week plus the control antibody at 10 mg/kg twice per week; one group received 59R1 at 10 mg/kg twice per week, and the fourth group received the

combination of 59R1 at 10 mg/kg twice per week and irinotecan at 7.5 mg/kg once per week. Tumor volumes were measured on the indicated days. The results are shown in Figure 10. Tumor growth was found to be inhibited by 59R1 alone relative to the control antibody group and by the combination of 59R1 and irinotecan relative to the irinotecan group.

[00334] The 59R1 IgG2 antibody was also tested *in vivo* in the breast tumor xenograft lines OMP-B34, OMP-B39, OMP-B44, PE13, and UM-T1, the pancreas tumor xenograft line OMP-PN8, and the colon tumor xenograft line OMP-C8. These tumor xenograft lines were established by adhering to procedures described in Al-Hajj et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:3983-3988. Female NOD/SCID immuno-compromised mice 7–10 weeks old were used for the establishment of the breast tumor xenografts and male NOD/SCID mice were used for the OMP-Pn8 and OMP-C8 tumor-models (Harlan, Indianapolis, Indiana). The 59R1 IgG2 antibody was also tested *in vivo* in a Colo-205 colon tumor xenograft model. Female immunodeficient *bg/nu XID* mice on a Swiss CD-1 background were used for the Colo-205 xenograft tumor model. In case of the breast cancer models, slow-releasing estrogen pellets (0.36 mg) had to be implanted. Mice were subcutaneously injected on the right flank with 50,000 (OMP-B34, OMP-B39, OMP-B44, PE13, and UM-T1) or $1x10^7$ (Colo-205) viable cells, respectively, in a mixture of PBS (without magnesium or calcium) and Matrigel at a 1:1 ratio. The injected total volume per mouse was 200 µl with 50% being Matrigel. Once the tumor had reached a size between 65-200 mm^3, the mice were randomized. Antibodies were administered weekly and tumors measured twice weekly. LZ1 (a human antibody that recognizes lyzozyme) or 1B711 (a murine IgG1 antibody that recognizes the hapten trinitrophenol) was used as a control antibody for treatment of each tumor type. Tumor volume was calculated as described Al-Hajj et al. (2003). Data are expressed as the mean and the mean ±S.E.M. Group means were compared using Student's two-tailed, unpaired t-test. Probability (P) values of <0.05 were interpreted as significantly different. All statistical analysis was performed using Microsoft EXCEL and Graph Pad PRISM.

[00335] The results of the additional *in vivo* experiments in Colo205, C8, PNA, B34, B39, B44, PE13, and T1 xenograft models are shown in Figures 11A-11H, respectively. As shown in Figure 11A, monotherapy with the 59R1 antibody significantly inhibited growth of the Colo205 tumor relative to the control antibody (LZ1) ($p<0.01$). Combination therapy with 59R1 plus the anti-VEGF antibody bevacizumab (AVASTIN) provided an even greater inhibition of tumor growth ($p<0.001$) than either 59R1 or bevacizumab alone. In another colorectal xenograft model, C8, 59R1 was likewise shown to inhibit tumor growth relative to LZ1 control antibody (Figure 11B). Similarly, 59R1 was found to inhibit pancreatic tumor growth (relative to control antibody) in the PN8 xenograft model (Figure 11C). 59R1 was also shown to inhibit breast cancer growth relative to a control antibody in each of the five breast cancer xenograft models B34 (Figure 11D), B39 (Figure 11E), B44 (Figure 11F), and PE13 (Figure 11G). The 59R1 antibody was likewise found to be effective at inhibiting tumor growth in the T1 breast cancer

model (Figure 11H), although it was only effective in the presence of estrogen, despite T1 being an estrogen receptor negative tumor.

Example 10

Effect of treatment with anti-Notch2/3 antibody 59R1 on gene regulation in xenograft tumor models

[00336] Gene expression levels in various xenograft tumor models treated with the 59R1 IgG2 antibody were analyzed by microarray analysis. Global gene expression profiling analysis was performed on Affymetrix HG-U133 plus 2.0 microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA). Three independent RNA samples of xenograft whole tumors from the control and treatment groups were isolated and hybridized to the microarrays according to the manufacturer's instructions. Scanned array background adjustment and signal intensity normalization were performed with GCRMA algorithm in the open-source bioconductor software (www.bioconductor.org). The expression level of each gene was normalized by z-score transformation across the samples in the control (CTRL) and treatment (59R1) groups. Genes differentially expressed ($p < 0.05$ and fold change > 2.0) between the two groups were identified with Bayesian t-test (Baldi et al., 2001, *Bioinformatics*, 17:509-519. The expression patterns of selected associated differentially regulated genes in selected tumor xenograft models (Colo205, B44, PE13, and T1) are shown in Table 5 below. The P-value (PVal) of each gene is the probability of significant regulation of the gene by 59R1 by chance using Bayesian t-test. A number of genes including the genes encoding regulator of G-protein signaling 5 (RGS5), Notch3, and hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like (HEYL) protein were shown to be significantly down-regulated in the stroma of the 59R1-treated mice relative to the control mice. (By contrast, these particular genes encoding RGS5, Notch3, and HEYL were not found to be significantly down-regulated in the human cells of the tumors.)

Table 5. Differentially expressed genes in stroma of 59R1-treated tumors

	Colo205		B44		PE13		T1	
Gene	Fold	pVal	Fold	pVal	Fold	pVal	Fold	pVal
1420942_s_at (Rgs5)	-5.52	7.65E-07	-2.43	5.59E-04	-4.23	2.86E-05	-1.18	9.82E-04
1417466_at (Rgs5)	-3.39	6.62E-07	-2.22	3.11E-04	-4.03	1.31E-10	-1.99	4.11E-04
1420941_at (Rgs5)	-5.10	1.66E-03	-2.09	1.18E-03	-2.99	1.35E-05	-1.97	2.07E-03
1421964_at (Notch3)	-3.26	3.70E-06	-2.03	2.30E-03	-1.91	1.67E-03	-1.01	8.86E-01
1416286_at (Rgs4)	-3.08	2.69E-03	-1.57	3.84E-02	-1.83	6.71E-05	-1.13	4.47E-01
1434141_at (Gucy1a3)	-2.49	2.87E-03	-1.74	1.07E-02	-4.18	1.49E-07	1.20	5.95E-01
1459713_s_at (Tmem16a)	-1.90	1.90E-03	-1.70	1.01E-02	-7.28	9.89E-10	-2.14	1.79E-04
1420872_at (Gucy1b3)	-1.94	1.90E-02	-1.65	7.68E-03	-3.06	8.52E-10	-1.01	7.13E-01
1422789_at (Aldh1a2)	-1.73	1.20E-02	-4.92	2.42E-08	-2.17	1.58E-04	-2.16	9.27E-04
1419302_at (Heyl)	-3.28	5.61E-03	-1.12	2.36E-01	-1.77	5.72E-04	-1.07	2.39E-02
1451501_a_at (Ghr)	-1.83	1.69E-02	-2.24	2.71E-04	-1.66	8.90E-04	-1.12	3.38E-01

1417714_x_at (Hba-a1/Hba-a2)	-8.37	2.49E-02	-2.56	4.63E-04	-1.92	1.06E-02	1.42	9.24E-01
1428361_x_at (Hba-a1/Hba-a2)	-8.91	1.93E-02	-2.42	1.08E-03	-1.73	4.27E-02	1.73	4.67E-01
1452590_a_at (Plac9)	-1.61	1.07E-02	-1.64	1.22E-02	-1.62	6.17E-03	1.20	7.36E-01
1449632_s_at (Fkbp10)	-1.72	1.69E-02	-1.57	1.12E-02	-1.63	1.80E-04	1.07	5.97E-01
1449280_at (Esm1)	2.07	1.06E-02	1.55	3.48E-02	1.56	4.35E-02	1.18	2.44E-01
1418829_a_at (Eno2)	1.79	2.92E-02	1.71	1.02E-02	1.54	5.43E-03	1.29	9.92E-02

[00337] The expression levels in the stroma from the xenograft models Colo205, B29, B34, B44, PE13, T1 (without estrogen treatment), T1 (with estrogen treatment), C8, and PN8 of selected genes that had been identified in the microarray analysis as being regulated by treatment with 59R1 (*heyl*, *notch3*, *rgs5*, *angpt1*, and *angpt2*) were further analyzed by TaqMan® analysis. The results are shown in Figures 12A (*heyl*), 12B (*notch3*), 12C (*rgs5*), 12D (*angpt1*), and 12E (*angpt2*).

[00338] The results of the TaqMan® analysis confirm that *notch3* and *rgs5* are down-regulated in the stroma of each of the various tumor types in response to treatment with 59R1 (relative to control) (Figures 12B and C). RGS5 is a well-known marker of pericytes and vascular smooth muscle cells (Berger et al., 2005, *Blood*, 105:1094-1101; Lovschall et al., 2007, *Int. J. Dev. Biol.*, 51: 715-721; Cho et al., 2003, *FASEB J.*, 17:440-2). Notch3 has been identified as being coexpressed with RGS5 in pericytes during angiogenesis and plyaing an important role in the regulation of the fate of pericytes and vascular smooth muscle cells (Lovschall et al., 2007, *Int. J. Dev. Biol.*, 51: 715-721; Domenga et al., 2004, *Genes & Dev.*, 18:2730-2735; Sweeney et al., 2004, *FASEB J.*, 18:1421-3; Morrow et al., 2005, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 289:C1188-C1196).

[00339] In addition, *heyl* was also confirmed to be downregulated in the stroma of each of the xenograft models except B34 (Figure 12A). HeyL belongs to the Hey family of downstream transcription factors of Notch signaling (Hey1, Hey2, and HeyL). The downregulation of *heyl* by 59R1 suggests that the 59R1 antibody directly affects Notch signaling by downregulating *heyl*.

[00340] *Angiopoietin-1 (angpt1)* and *angiopoietin-2 (angpt2)* were also determined to be down-regulated in the stroma of a number of the breast cancer models (Figures 12D and E). ANGPT1 and 2 (angiopoietin-1 and -2) are ligands for the TIE 1 and 2 receptors. TIE receptors, like VEGF, are crucial signaling molecules in neoangiogenesis processes (Jones et al., 2001, *Nature Reviews*, 2:257-267).

[00341] Notably, however, *angpt1* and *angpt2* were down-regulated in the stroma of the T1 model when estrogen treatment was used ("T1 e"), conditions under which treatment with 59R1 was effective against tumor growth, but not in the stroma of the same model in the absence of estrogen treatment ("T1 ne"), conditions under which treatment with 59R1 was ineffective against tumor growth (see Example 9, above). Thus, the effect of 59R1 on the down-regulation of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in the stroma of the T1 tumor is abrogated in the absence of estrogen treatment. One possible explanation of this effect is that in the absence of estrogen treatment, the levels of the growth factors angiopoietin-1 and

angiopoietin-2 in the T1 stroma are not sufficiently elevated to provide for measurable decreases in expression levels upon treatment with the 59R1 antibody. Estrogen has been shown to have significant effects on the tumor microenvironment (Banka et al., 2006, *Cancer Res.* 66:3667-3672). One possible explanation of this data is that estrogen leads to a dependence of the tumor on ANGPT2 signaling, which then leads to sensitivity to 59R1 treatment.

Example 11

Anti-Notch2/3 antibody 59R1 significantly induces hypoxia in colon and breast tumors

[00342] Staining for hypoxic regions was performed in Colo-205 colon tumors and PE-13 breast tumors that had been treated either with 59R1 IgG2 antibody or with 1B711 control antibody. The staining was performed as described in Ridgway et al., 2006, *Nature* 444:1083-1087. Briefly, to measure hypoxia, pimonidazole-hydrochloride (HypoxyProbe, NPI, Burlington, MA), which forms long-lived protein adducts at partial pressure of oxygen less than approximately 10 mm Hg, was injected intraperitoneally at 60 mg/kg 1 hr prior to sacrifice. Tumors were then processed for histological analysis, and tumor sections were stained using anti-pimonidazole antibody following manufacturer's protocol (NPI). Photographs were taken using a BX51 microscope (Olympus, Center Valley, PA).

[00343] Viable tumor cells were found to be equally present in 1B711 and 59R1-treated tumors, as indicated by a relatively uniform and dense DAPI stain (data not shown). The number of CD31-positive cells also remained unchanged, suggesting that endothelial cell number was not affected by 59R1 treatment. In 59R1-treated Colo-205 and PE13 tumors, however, hypoxic regions (as detected by anti-pimonidazole antibody) were significantly more pronounced than in 1B711 treated tumors (data not shown). AF594-conjugated goat anti-rat $F(ab')_2$ was used to detect anti-CD31 antibody and FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody was used to detect anti-pimonidazole antibody.

Example 12

Breast tumors comprising deletions in the PTEN tumor suppressor gene are responsive to treatment with 59R1

[00344] DNA samples were prepared from tumor cells of xenograft breast cancers. Before the DNA isolation, mouse stroma cells in the xenograft tumors were depleted using magnetic beads conjugated with mouse cell specific antibodies. The purified DNA samples were hybridized to Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 genechip (Affymetrix, Santa Clara, CA), which has more than 946,000 probes for the detection of copy number variations (CNVs), according to the manufacturer's instructions. The copy number state changes were estimated by Hidden Markov Model (HMM) and their variations (CNVs) of each sample were obtained by rank segmentation analysis using Hapmap270 as baseline. Due to the

inherent noise in the array, -0.5 and -1.0 log2 ratios were used as the cutoffs for the heterozygous deletion and homozygous deletion under the significance threshold $<1.0\times10^{-6}$ and minimum number of probes per segment =5.

[00345] Figure 13 shows the exon, Affymetrix probe distribution, and the deletions in the gene of the tumor suppressor phosphatase tensin homolog (PTEN) in chromosome 10. The B29, B34, B37, B40, B51, T2, T3, and T6 breast tumors were found to have intact PTEN genes in their genomes. The PTEN gene was determined to harbor homozygous deletions in B39 tumor, while B44, PE13, and T1 tumors were determined to have heterozygous deletions of this gene. As discussed above, 59R1 was determined to have anti-tumor efficacy in each of these four breast tumors comprising homozygous or heterozygous deletions of PTEN. These results suggest that tumors, especially breast tumors, harboring homozygous or heterozygous PTEN deletions may be particularly suitable for treatment with an anti-Notch2/3 antibody such as 59R1.

Example 13

Characterization of 59R5 Antibody

[00346] An additional human antibody 59R5 that specifically binds human Notch 2 and human Notch 3 was identified. The sequences of the heavy chain and light chain are provided in SEQ ID NO: 49 and SEQ ID NO:18, respectively. The heavy chain variable region is provided in SEQ ID NO:50 and the light chain variable region is provide SEQ ID NO:13. The heavy chain CDR3 sequence of 59R5 comprises SIFYTT, SEQ ID NO:51. The other CDR sequences of 59R5 are identical to 59R1. Biacore analysis of 59R1 and 59R5 binding affinities indicated that 59R5 had similar binding properties for both Notch2 and Notch3 as 59R1. Both antibodies bind human and murine Notch2 and Notch3 receptors with sub-nanomolar affinity (see Table 6).

Table 6

IgG Dissociation Constants (K_D, nM)							
	m-Notch1	h-Notch1	m-Notch2	h-Notch2	m-Notch3	h-Notch3	h-Notch4
59R1	>10	>10	0.65	0.05	0.32	0.19	NB
59R5	>10	>10	0.26	0.05	0.29	0.22	NB

[00347] 59R5 was determined to have similar activity in blocking Notch2 and Notch3 signaling as 59R1. Receptor activation was determined in luciferase-based assays. PC3 tumor cells were transiently transfected with a human or mouse Notch receptor (human Notch2, murine Notch2, human Notch3, or murine Notch3) and GFP inducible reporter construct. Transfected cells were incubated with different concentrations of 59R1 or 59R5 antibody in the presence of passively immobilized DLL4-Fc protein.

Notch receptor activation was determined by measuring luciferase activity. As shown in Figure 15A, 59R5 blocked ligand-induced activation of human Notch2, murine Notch2, human Notch3 and murine Notch3 receptor signaling at similar levels as 59R1.

[00348] The binding epitope of 59R5 was determined. As was described in Example 3 for analysis of antibody 59R1, several point mutants were created within full-length Notch1, converting residues within EGF10 to the corresponding amino acids in human Notch 2. Mutants in full-length Notch sequences were generated by QuikChange® mutagenesis (Stratagene) and verified by sequencing. HEK 293 cells were transiently transfected with expression vectors encoding human Notch2, human Notch1, or human Notch1 with residues 382-386 mutated to the corresponding human Notch2 residues. Cells were also co-transfected with a plasmid encoding green fluorescent protein (GFP) to mark those cells that received transfected plasmid. Cells were incubated with 59R1 or 59R5 and fluorescent secondary antibody and then examined by FACS. 59R1 and 59R5 were detected by PE-conjugated goat anti-human Fc gamma specific antibody (Jackson Immunochemicals, #109-116-170). As shown in Figure 15B, 59R5 bound to Notch2 and did not bind to Notch1. However, when amino acids corresponding to Notch2 amino acids 385-389 were substituted into Notch1, 59R5 was able to bind to the mutated Notch1. This suggested that at least one or more amino acids necessary for 59R5 binding to human Notch 2 were positioned within amino acids 385-389 (residues in the boxed hNotch2 sequence shown in Figure 14A) and suggested that 59R5 binds the same epitope as 59R1, or an epitope similar to, or overlapping with, the epitope of 59R1.

Example 14

In vivo treatment of tumors using Notch2/3 antibody 59R5

[00349] In one embodiment, NOD/SCID mice were injected with PE13 breast tumor cells. The mice were treated with anti-Notch2/3 antibody 59R1, anti-Notch2/3 antibody 59R5, or control antibody. Antibodies were dosed at 15 mg/kg once per week in a "preventative" mode where dosing was initiated two days after cell injection. Figure 16A shows that 59R5 treatment inhibited tumor growth by greater than 80%, similar to the effects seen with 59R1.

[00350] In another embodiment, NOD/SCID mice were injected with C28 colon tumor cells. The mice were treated with anti-Notch2/3 antibody 59R1, anti-Notch2/3 antibody 59R5 or control antibody. Antibodies were dosed at 15 mg/kg once per week in a "preventative" mode where dosing was initiated two days after cell injection. Figure 16B shows that both 59R1 and 59R5 inhibited the growth of C28 colon tumors.

[00351] In another embodiment, NOD/SCID mice were injected with Colo205 colon tumor cells. The mice were treated with anti-Notch2/3 antibody 59R1, anti-Notch2/3 antibody 59R5 or control antibody. Antibodies were dosed at 15 mg/kg once per week after tumors had been established. Figure

16C shows that both 59R1 and 59R5 inhibited the growth of Colo208 colon tumors at similar levels.

Example 15

In vivo treatment of tumors using Notch2/3 antibody 59R5 in combination treatment

[00352] In one embodiment, NOD/SCID mice were injected with PN8 pancreatic tumor cells. The tumors were allowed to grow for approximately 33 days until they had reached an average tumor volume of 150mm^3. The mice were treated with gemcitabine at 20 mg/kg once per week for four weeks in combination with control antibody, anti-Notch2/3 antibody 59R1, or anti-Notch2/3 antibody 59R5. As shown in Figure 17A, antibody 59R5 inhibited tumor growth at a similar level as antibody 59R1 and that combination treatment prolonged tumor recurrence longer than gemcitabine alone.

[00353] In one embodiment, to evaluate the effect of 59R5 on cancer stem cells, a tumor recurrence study was carried out in the PE13 breast tumor model. NOD/SCID mice were injected with PE13 breast tumor cells. The tumors were allowed to grow for 40 days before treatments were initiated. The mice were treated with taxol at 15 mg/kg twice per week for 5 weeks, in combination with either control antibody or anti-Notch 2/3 antibody 59R5. After 5 weeks, the taxol treatments were stopped and the antibody treatments were continued. 59R5 was observed to significantly delay tumor recurrence after high-dose taxol treatment (Fig. 17B). These results suggest that 59R5 treatment reduces cancer stem cell frequency.

[00354] A summary of the *in vivo* activity of 59R1 and 59R5 as described in the preceding embodiments is shown in Table 7. Tumor volumes and p values for each experiment are shown relative to the control group. The PE13, C28 and Colo205 studies were carried out as described in Example 14. PN8 studies were carried out as described above. For the PN8 experiment, the control is gemcitabine alone and values for 59R1 and 59R5 are the combinations with gemcitabine. Antibodies were dosed once per week at 15 mg/kg for all experiments.

Table 7

	PE13		**C28**		**Colo205**		**PN8**	
	Tumor vol	p value	Tumor vol	p value	Tumor vol	p value	Tumor vol	p value
59R1	0.25	<0.0001	0.29	<0.0001	0.68	0.003	0.27	0.026
59R5	0.18	<0.0001	0.38	<0.0001	0.61	0.001	0.11	0.036

Example 16

Regulation of Gene Expression in Tumors after 59R5 Treatment

[00355] To determine if 59R5 and 59R1 were functioning by the same mechanisms *in vivo*, the expression of key target genes in tumor cells and tumor stroma were examined. Gene expression was assayed by

quantitative PCR in PE13 tumor cells and stromal cells. Gene expression levels relative to the control antibody treated group are shown in Figure 18. 59R1 and 59R5 regulated the expression of murine HeyL, Notch3, and RGS5 in stromal cells to a similar extent (left panel). The same pattern of regulation was observed in C28 tumors (data not shown). Thus, the mechanism of action previously identified for 59R1 in regulating genes in the tumor stromal critical for function of the tumor vasculature and pericytes was retained by 59R5. Similarly, 59R5 and 59R1 regulated the expression of the human genes ID4, EDNRA, and EGLN3 in tumor cells to the same degree (right panel).

[00356] Unlike other members of this gene family, ID4 is generally underexpressed in tumors, and ID4 has been shown to be a tumor suppressor in breast cancer that is frequently silenced by methylation. Loss of expression of ID4 is correlated with a worse prognosis in breast cancer patients (Noetzel et al., 2008, *BMC Cancer* 8:154). Thus, up-regulation of ID4 in PE13 breast tumor cells may be part of the anti-tumor mechanism of anti-Notch2/3. EDNRA is the gene encoding endothelin receptor which promotes growth of both endothelial and tumor cells and stimulates metastatic activity of tumor cells (Bagnato and Rosano 2008, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40:1443-51). EGLN3 (also known as HIF-3α) is a hypoxia inducible gene. Induction of EGLN3 by anti-Notch2/3 is consistent with disruption of functional vasculature in the treated tumors. These data indicated that the biological activities and mechanism of action of 59R1 and 59R5 were very similar.

[00357] Table 8 shows results from a microassay analysis of 59R1 and 59R5 treated PE13 tumors. The numbers are mean differential expression values for treated vs. control animals, with 3 animals per group.

Table 8

59R1		59R5			
Fold	**pVal**	**Fold**	**pVal**	**Symbol**	**Gene Title**
-5.10	3.21E-05	-3.00	1.10E-03	Foxc2	forkhead box C2
-4.40	1.26E-05	-2.46	7.45E-04	Hey2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2
-4.32	8.03E-06	-2.14	1.00E-04	Rgs5	regulator of G-protein signaling 5
-3.33	5.59E-04	-2.79	3.18E-03	Heyl	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like
-2.71	4.80E-04	-2.90	1.02E-04	Rgs4	regulator of G-protein signaling 4
-2.10	2.17E-04	-1.86	4.33E-05	Notch3	Notch gene homolog 3 (Drosophila)
-1.92	3.16E-02	-2.35	3.43E-03	Mmp9	matrix metallopeptidase 9
2.36	3.06E-02	4.97	3.35E-02	Pdcd1lg2	programmed cell death 1 ligand 2
7.42	6.25E-07	2.80	2.07E-03	Gzma	granzyme A

[00358] Microarray analysis reveals that 59R5 significantly inhibited the Notch pathway ($p<0.01$) as measured by gene expression (e.g., *Foxc2, Hey2, Heyl, Notch3*). These results were comparable to 59R1. *Foxc2* is a down-stream target of the Hedgehog pathway and is involved in cell differentiation. Additional genes involved in apoptosis (e.g., granzyme A) and tumor-associated tissue remodeling

(MMP-9) were also similarly expressed between 59R1 and 59R5. These data suggested that the biological activities and mechanism of action of 59R1 and 59R5 are very similar.

Example 17

Production of additional Notch2 and/or Notch3 antibodies

Antigen Production

[00359] In certain embodiments, recombinant polypeptide fragments of the human Notch2 or human Notch3 extracellular domain are generated as antigens for antibody production. For example, standard recombinant DNA technology can be used to isolate a polynucleotide encoding amino acids 1-493 of Notch2 (SEQ ID NO: 33), encompassing EGF 1-12. This polynucleotide can be ligated in-frame N-terminal to either a human Fc-tag or histidine-tag and cloned into a transfer plasmid vector for baculovirus mediated expression in insect cells. Standard transfection, infection, and cell culture protocols can be used to produce recombinant insect cells expressing the corresponding Notch2 polypeptide (SEQ ID NO: 34) (O'Reilly et al., 1994, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press).

[00360] Cleavage of the endogenous signal sequence of human Notch2 was approximated using cleavage prediction software SignalP 3.0, however the actual *in vivo* cleavage point can differ by a couple of amino acids either direction. The predicted cleavage of Notch2 is between amino acids 1 and 26, thus Notch2 antigen protein comprises approximately amino acid 27 through amino acid 493. Antigen protein can be purified from insect cell conditioned medium using Protein A and Ni^{++}-chelate affinity chromatography. Purified antigen protein is then dialyzed against PBS (pH=7), concentrated to approximately 1 mg/ml, and sterile filtered in preparation for immunization.

Immunization

[00361] Mice can be immunized with purified Notch2 or Notch3 antigen protein using standard techniques. Blood from individual mice can be screened approximately 70 days after initial immunization for antigen recognition using ELISA and FACS analysis (described in detail below). The animals with the highest antibody titers are then selected for final antigen boost after which spleen cells are isolated for hybridoma production. Hybridoma cells are plated at 1 cell per well in 96 well plates, and the supernatant from each well screened by ELISA and FACS analysis against antigen protein. Several hybridomas with high antibody titer are selected and scaled up in static flask culture. Antibodies are purified from the hybridoma supernatant using protein A or protein G agarose chromatography and antibodies are tested by FACS as described below.

FACS analysis

[00362] To select monoclonal antibodies produced by hybridomas, clones that recognize native cell-surface Notch2 (and/or Notch3) protein, FACs analysis is used. HEK293 cells are co-transfected with expression vectors encoding a full-length cDNA clone of Notch2 and the transfection marker GFP. Twenty-four to forty-eight hours post-transfection, cells are collected in suspension and incubated on ice with anti-Notch2 (or anti-Notch3 or anti-Notch2/3) antibodies or control IgG to detect background antibody binding. The cells are washed and primary antibodies detected with anti-mouse secondary antibodies conjugated to a fluorescent chromophore. Labeled cells are then sorted by FACS to identify anti-Notch2, anti-Notch3, or anti-Notch2/3 antibodies that specifically recognize cell surface expression of native cell-surface Notch2 and/or Notch3 protein.

Chimeric antibodies

[00363] After monoclonal antibodies that specifically recognize a non-ligand binding domain of a Notch receptor are identified, these antibodies are modified to overcome the human anti-mouse antibody (HAMA) immune response when rodent antibodies are used as therapeutics agents. The variable regions of the heavy-chain and light-chain of the selected monoclonal antibody are isolated by RT-PCR from hybridoma cells and ligated in-frame to human IgG1 heavy-chain and kappa light chain constant regions, respectively, in mammalian expression vectors. Alternatively a human Ig expression vector such as TCAE 5.3 is used that contains the human IgG1 heavy-chain and kappa light-chain constant region genes on the same plasmid (Preston et al., 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42). Expression vectors encoding chimeric heavy- and light-chains are then co-transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells for chimeric antibody production. Immunoreactivity and affinity of chimeric antibodies are compared to parental murine antibodies by ELISA and FACS.

Humanized antibodies

[00364] As chimeric antibody therapeutics are still frequently antigenic, producing a human anti-chimeric antibody (HACA) immune response, chimeric antibodies against a Notch2 or Notch3 receptor can require further humanization. To generate humanized antibodies the three short hypervariable sequences, or complementary determining regions (CDRs), of the chimeric antibody heavy- and light-chain variable domains described above are engineered using recombinant DNA technology into the variable domain framework of a human heavy- and light-chain sequences, respectively, and then cloned into a mammalian expression vector for expression in CHO cells. The immunoreactivity and affinity of the humanized antibodies are compared to parental chimeric antibodies by ELISA and FACS. Additionally, site-directed or high-density mutagenesis of the variable region can be used to optimize specificity, affinity, etc. of the humanized antibody.

Example 18

Additional *in vitro* assays to evaluate antibodies against a Notch receptor

[00365] This example describes methods for *in vitro* assays to test the activity of antibodies generated against a Notch2 and/or Notch3 receptor on cell proliferation and cytotoxicity.

Proliferation Assay

[00366] Antibodies against Notch2 and/or Notch3 are tested for their effect on tumor cell growth *in vitro* using a BrdU based assay. Freshly dissociated, Lin-depleted breast tumor cells are cultured in low oxygen for between 2-5 days. Cells are then cultured at 20,000 cells/well with 2.5 μg/mL or 5.0 μg/mL anti-Notch antibody, control non-specific murine IgG, or no antibody for three days followed by 18 hours BrdU labeling. All experiments are performed with multiple replicates. The ability of anti-Notch antibodies to inhibit cell proliferation compared to control antibodies is then determined.

Complement-dependent cytotoxicity assay

[00367] Cancer cell lines expressing a Notch2 receptor and/or a Notch3 receptor or, alternatively, cancer stem cells isolated from a patients sample passaged as a xenograft in immunocompromised mice are used to measure complement dependent cytotoxicity (CDC) mediated by an antibody against a Notch 2 and/or Notch3 receptor. Cells are suspended in 200 μl RPMI 1640 culture medium supplemented with antibiotics and 5% FBS at 106 cells/ml. Suspended cells are then mixed with 200 μl serum or heat-inactivated serum with antibodies against a Notch2 and/or Notch3 receptor or control antibodies in triplicate. Cell mixtures are incubated for 1 to 4 hours at 37°C in 5% CO_2. Treated cells are then collected, resuspended in 100 μl FITC-labeled annexin V diluted in culture medium and incubated at room temperature for 10 min. One hundred μl of a propidium iodide solution (25 μg/ml) diluted in HBSS is added and incubated for 5 min at room temperature. Cells are collected, resuspended in culture medium and analyzed by flow cytometry. Flow cytometry of FITC stained cells provides total cell counts, and propidium iodide uptake by dead cells as a percentage of total cell numbers is used to measure cell death in the presence of serum and antibodies against a Notch2 and/or Notch3 receptor compared to heat-inactivated serum and control antibodies. The ability of anti-Notch2/3 antibodies to mediated complement-dependent cytotoxicity is thus determined.

Antibody-dependent cellular cytotoxicity assay

[00368] Cancer cell lines expressing a Notch2 receptor and/or a Notch3 receptor or, alternatively, cancer stem cells isolated from a patients sample passaged as a xenograft in immunocompromised mice (described in detail below) are used to measure antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)

mediated by an antibody against a Notch2 and/or Notch3 receptor. Cells are suspended in 200 µl phenol red-free RPMI 1640 culture medium supplemented with antibiotics and 5% FBS at 106 cells/ml. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are isolated from heparinized peripheral blood by Ficoll-Paque density gradient centrifugation for use as effector cells. Target cells (T) are then mixed with PBMC effector cells (E) at E/T ratios of 25:1, 10:1 and 5:1 in 96-well plates in the presence of a Notch2 or Notch3 receptor or control antibodies. Controls include incubation of target cells alone and effector cells alone in the presence of antibody. Cell mixtures are incubated for 1 to 6 hours at 37°C in 5% CO_2. Released lactate dehydrogenase (LDH), a stable cytosolic enzyme released upon cell lysis, is then measured by a colorimetric assay (e.g., CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay; Promega; Madison, WI). Absorbance data at 490 nm are collected with a standard 96-well plate reader and background corrected. The percentage of specific cytotoxicity is calculated according to the formula: % cytotoxicity = 100 x (experimental LDH release – effector spontaneous LDH release – target spontaneous LDH release) / (target maximal LDH release – target spontaneous LDH release). The ability of antibodies against a Notch2 and/or Notch3 receptor to mediated antibody dependent cellular cytotoxicity is thus determined.

Example 19

Production of antibodies against EGF10 (or equivalent EGF) of Notch receptors

[00369] Identification of an antibody that specifically binds the tenth EGF repeat of Notch2 and the corresponding EGF repeat of Notch3 (the ninth EGF repeat) that reduces tumor growth in animals suggests the importance of the non-ligand binding domain, and the tenth EGF repeat (or its equivalent) in particular, for effective cancer therapies. To target the EGF repeat 10 (or equivalent EGF) in Notch receptor family members, antibodies against EGF10 of Notch1, Notch2, or Notch4 or against EGF9 of Notch3 are produced and analyzed. Specifically, mice are immunized with antigens comprising the tenth EGF repeat of Notch1 (SEQ ID NO:35); Notch2 (SEQ ID NO:36), or Notch4 (SEQ ID NO:38) or the ninth EGF repeat of Notch3 (SEQ ID NO:37). Antibodies that recognize specific Notch receptors as well as antibodies that recognize different combinations of the four Notch receptors are identified using FACS analysis of HEK 293 cells transfected with each Notch receptor as described in detail above. Antibodies that recognize the tenth EGF repeat (or equivalent EGF) of two Notch receptor family members are envisioned (e.g. antibodies that recognize the Notch1 EGF10 and Notch2 EGF10; Notch1 EGF10 and Notch3 EGF9; Notch1 EGF10 and Notch4 EGF10; Notch2 EGF10 and Notch3 EGF9; Notch2 EGF10 and Notch4 EGF10; or Notch3 EGF9 and Notch4 EGF10). Antibodies that recognize the tenth EGF repeat (or equivalent EGF) of three Notch receptor family members are likewise contemplated (e.g., antibodies that recognize the Notch1 EGF10, Notch2 EGF10, and Notch3 EGF9; Notch1 EGF10, Notch2 EGF10, and

Notch4 EGF10; or Notch2 EGF10, Notch3 EGF9, and Notch4 EGF10). And antibodies that recognize the tenth EGF repeat (or equivalent EGF) of four Notch receptor family members are envisioned (e.g. antibodies that recognize the Notch1 EGF10, Notch2 EGF10, Notch3 EGF9 and Notch4 EGF10).

Example 20

Treatment of human cancer using anti-Notch receptor antibodies

[00370] This example describes methods for treating cancer using antibodies against a Notch receptor to target tumors comprising cancer stem cells and/or tumor cells in which Notch receptor expression has been detected.

[00371] The presence of cancer stem cell marker expression can first be determined from a tumor biopsy. Tumor cells from a biopsy from a patient diagnosed with cancer are removed under sterile conditions. In some embodiments, the tissue biopsy is fresh-frozen in liquid nitrogen, embedded in O.C.T., and cut on a cryostat as 10 μm sections onto glass slides. Alternatively the tissue biopsy is formalin-fixed, paraffin-embedded, and cut on a microtome as 10 μm section onto glass slides. Sections are incubated with antibodies against a Notch receptor to detect protein expression. Additionally, the presence of cancer stem cells can be determined. Tissue biopsy samples are cut up into small pieces, minced completely using sterile blades, and cells subject to enzymatic digestion and mechanical disruption to obtain a single cell suspension. Dissociated tumor cells are then incubated with anti-ESA, -CD44, -CD24, and –Lin, antibodies to detect cancer stem cells, and the presence of ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- tumor stem cells is determined by flow cytometry as described in detail above.

[00372] Cancer patients whose tumors are diagnosed as expressing a Notch receptor are treated with anti-Notch receptor antibodies. Humanized or human monoclonal anti-Notch receptor antibodies generated as described above are purified and formulated with a suitable pharmaceutical carrier in PBS for injection. Patients are treated with the Notch antibodies once a week for at least 10 weeks, but in certain cases once a week for at least about 14 weeks. Each administration of the antibody should be a pharmaceutically effective dose about 2 to about 100 mg/ml and in certain cases between about 5 to about 40 mg/ml. The antibody can be administered prior to, concurrently with, or after standard radiotherapy regimens or chemotherapy regimens using one or more chemotherapeutic agent, such as paclitaxel, gemcitabine, irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, leucovorin, or streptozocin. Patients are monitored to determine whether such treatment has resulted in an anti-tumor response, for example, based on tumor regression, reduction in the incidences of new tumors, lower tumor antigen expression, decreased numbers of cancer stem cells, or other means of evaluating disease prognosis.

Example 21

Production of antibodies against Notch1, Notch2, Notch3, and/or Notch4 EGF repeat 4

[00373] To target the EGF repeat 4 in Notch receptor family members, antibodies against Notch1, Notch2, Notch3, and/or NOTCH4 EGF repeat 4 are produced and analyzed. Specifically, mice are immunized with antigens comprising the fourth EGF repeat of Notch1 (SEQ ID NO:41), Notch2 (SEQ ID NO:42), Notch3 (SEQ ID NO: 43), or Notch4 (SEQ ID NO:44). Antibodies that recognize specific Notch receptors as well as antibodies that recognize different combinations of the four Notch receptors are identified using FACS analysis of HEK 293 cells transfected with each Notch receptor as described in detail above. Antibodies that recognize the fourth EGF repeat of two Notch receptor family members are envisioned (e.g. antibodies that recognize the fourth EGF repeat of Notch1 and Notch2; Notch1 and Notch3; Notch1 and Notch4; Notch2 and Notch3; Notch2 and Notch4; or Notch3 and Notch4). Antibodies that recognize the fourth EGF repeat of three Notch receptor family members are envisioned (e.g. antibodies that recognize the fourth EGF repeat of Notch1, Notch2, and Notch3; Notch1, Notch2, and Notch4; or Notch2, Notch3, and Notch4). And antibodies that recognize the fourth EGF repeat of four Notch receptor family members are envisioned (e.g. antibodies that recognize the fourth EGF repeat of Notch1, Notch2, Notch3 and Notch4).

[00374] A description of the exemplary production and characterization of a monoclonal antibody, 13M57, that binds EGF4 of Notch1 can be found in U.S. Patent Application Publication No. 2008/0131434, which is incorporated by reference herein in its entirety.

Example 22

Additional gene expression assays in tumor cells treated with 59R1

[00375] Changes in gene expression in response to 59R1 treatment in tumor cells in xenograft models were identified.

[00376] Several pathways/gene sets that are regulated by antibody 59R1 in tumor cells were identified (Table 9) using Gene Set Enrichment Analysis (Mootha et al., 2003, *Nature Genetics* 34:267-73; Subramanian et al., 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15545-50) in the breast tumors T1, PE13, and B51. Notably, cell cycle gene pathways, myc-activating genes and several stem cell gene sets are down-regulated by 59R1 in this analysis. cMyc has been shown to be a direct target of the Notch pathway (Weng et al., 2006, *Genes Dev.* 20:2096-109). The stem cell gene sets down-regulated by 59R1 were derived from a molecular signature derived from five distinct populations: human fetal hematopoietic stem cells (HCS), murine fetal and adult HSCs, neural stem cells (NSC), and embryonic stem cells (ESC) (Ivanova et al., 2002, *Science* 298:601-604), and also a recently described core ESC gene set (Ben-Porath et al., 2008, *Nature Genetics* 40:499-507) and an ESC self-renewal gene set whose down-regulation causes differentiation (Hu et al., 2009, *Genes Dev.* 23:837-48).

Table 9

Name	Size	FDR	Description
NGUYEN KERATO UP NOTCH	27	0.0774	Genes concomitantly modulated by activated Notch1 in mouse and human primary keratinocytes-Up
CELLCYCLEPATHWAY	22	0.0798	Cyclins interact with cyclin-dependent kinases to form active kinase complexes that regulate progression thr
YU CMYC UP	28	0.0884	Myc-activated genes
HSC STHSC FETAL	27	0.0885	Up-regulated in mouse short-term functional hematopoietic stem cells from fetal liver (ST-HSC Shared)
HSC STHSC SHARED	27	0.0907	Up-regulated in mouse short-term functional hematopoietic stem cells from both adult bone marrow an
WEINBERG ESC EXP2	30	0.1001	40 genes specifically overexpressed in hES cells according to Meta-analysis of 8 profiling studies (Natu
ESC SELF RENEWAL	30	0.1087	Genes identified by a genome-wide RNAI screen, whose downregulation caused mESC differentiation
BRENTANI REPAIR	33	0.1122	Cancer related genes involved in DNA repair

FDR <15%

Example 23

Reduction of cancer stem cell frequency by Notch2/3 antibodies

[00377] Using a similar experimental study as described in Example 8, an analysis of cancer stem cell frequency by limiting dilution analysis was carried out in PE13 breast cancer cells. Animals bearing PE13 breast tumors were treated with control antibody, taxol plus control antibody, 59R1, or taxol plus 59R1 for three weeks. Tumors were harvested after three weeks, and CSC frequency in the treated tumors was analyzed. Serial titrations of human cells from each the four treatment groups were transplanted into a new set of mice (n =10 per cell dose). Tumor growth rate after 75 days of growth (Figure 19A) was used to calculate the CSC frequency using the L-calc program (Stem Cell Technologies, Inc.). The control antibody treated tumors were determined to have a tumor initiating cell frequency of 1:74. Treatment with taxol alone increased the CSC frequency to 1:30. In contrast, treatment with 59R1 decreased CSC frequency to 1:179 and the combination of 59R1 plus taxol decreased CSC frequency to 1:319 (Figure 19B). A single asterisk indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) vs. the control antibody treated group and a double asterisk indicates a significant difference vs. the taxol and control antibody treated group. This experiment indicated that 59R1 treatment of PE13 breast tumors reduced CSC frequency as a single agent and more dramatically, in combination with taxol treatment. In contrast, treatment with taxol alone, while effective at reducing tumor volume, increased the CSC frequency of treated tumors indicating that tumor initiating cells are preferentially resistant to the effects of this chemotherapeutic agent.

[00378] In addition to investigating the effects of 59R1 in tumors and the effect on CSC frequency, gene changes were studied following 59R1 treatment in combination with taxol. The experiment was performed in PE13 breast tumors where a decrease in CSC frequency after treatment with 59R1 alone or 59R1 plus taxol treatment had previously been observed (and described herein). Microarray analysis was

performed on tumors from the same experiment where limiting dilution analyses of PE13 were carried out for CSC quantification (Figure 19). Animals bearing PE13 breast tumors were treated three weeks with 59R1 plus taxol, control and taxol prior to harvesting for microarray analysis. Mean differential expression values for taxol vs. control and 59R1 plus taxol vs. taxol treated animals (3 animals per group) were calculated. Strikingly, in the gene expression microarray data, it was found that 59R1 in combination with taxol affected apoptosis, hypoxia, differentiation, and stem-cell related genes in the opposite fold direction than the gene changes observed following with taxol alone (Table 10) consistent with the effects of these compounds on the CSC frequency.

Table 10

Taxol vs. control		59R1 Taxol vs. Taxol			
Fold	pval	Fold	pval	Symbol	Name
10.2	6.8E-03	-4.3	2.3E-01	BMPR1B	bone morphogenetic protein receptor, type IB
-2.1	4.2E-05	1.8	6.9E-05	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
-21.1	1.0E-02	11.9	3.9E-04	EGLN3	egl nine homolog 3
13.4	5.9E-05	-1.8	1.2E-01	HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6
2.2	1.5E-02	-2.5	1.9E-03	ITGAM	integrin, alpha M
4.6	3.6E-03	-4.4	5.2E-03	LHX8	LIM homeobox 8
-9.0	2.0E-06	6.4	1.8E-05	NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1
6.4	6.9E-06	-2.2	7.4E-03	RARRES1	retinoic acid receptor responder 1
2.6	3.5E-04	-1.7	1.1E-03	RARRES3	retinoic acid receptor responder 3
4.8	3.9E-05	-2.2	1.6E-02	RBP2	retinol binding protein 2, cellular
10.6	1.3E-10	-1.5	5.9E-02	XAF1	XIAP associated factor 1

[00379] The apoptosis-related genes regulated in this dataset include BNIP3, NDRG1 HSPB6, and XAF1. BNIP3 (Bcl-2/E1B 19 kDa interacting protein) is a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family that is expressed in hypoxic regions of tumors (Kothari et al., 2003, *Oncogene* 22:4734-44). BNIP3 is down-regulated by taxol alone and up-regulated by the combination therapy, suggesting that 59R1 plus taxol may promote apoptosis. Consistent with this idea is the observation that HSPB6 is down-regulated in taxol treated tumors; HSPB6 over-expression may protect against apoptosis in some biological systems (Fan et al., 2005, *Trends Cardiovasc. Med.* 15:138-41). NDRG1 (N-myc downstream regulated gene1), which is up-regulated in the combination treatment, is necessary for p53-dependent apoptosis (Stein et al., 2004, *J. Biol. Chem.* 279:48930-40). Interestingly, NDRG1 is also a putative suppressor of colorectal cancer metastases. Its increased expression is associated with improved survival in prostate and breast cancer (Shah et al., 2005, *Clin. Cancer Res.* 11:3296-302). Additionally, NDRG1 is involved in promoting differentiation. The expression of NDRG1 has been shown to be highly expressed in well-differentiated pancreatic cancer cells, and not expressed in the less differentiated tumor cells (Angst et al., 2006, *Br. J. Cancer* 95:307-13). It was also observed that other stem cell-related genes such BMPR1B

and homeobox containing gene, LHX8, were up-regulated by taxol alone, and then down-regulated with 59R1 treatment in combination with taxol.

[00380] Several genes involved in the metabolism of retinoids (RARRES1, RARRES3, RBP2), which are similar functionally to the putative stem cell marker, ALDH1a1, were up-regulated by taxol, and then down-regulated with taxol plus 59R1 treatment. Retinoic acid signaling has been shown to be linked to cellular differentiation (Appel and Eisen, 2003, *Neuron* 40:461-4). Taken together, these data show that 59R1 has significant effects on gene expression in PE13 breast tumor cells and may begin to elucidate some of the mechanisms that underlie the observed decrease in cancer stem cell frequency in this tumor following treatment with 59R1 and taxol combination therapy.

[00381] In another embodiment, a PN4 pancreatic tumor model was used to test for reduction in cancer stem cell frequency after treatment with 59R1. PN4 pancreatic tumors were treated with control antibody, anti-Notch2/3 59R1, gemcitabine, or a combination of 59R1 and gemcitabine for a period of three weeks. Antibodies were dosed at 10 mg/kg, twice per week and gemcitabine was dosed at 50 mg/kg, twice per week. Tumors from each group were harvested and processed to obtain single cell suspensions. The human tumors cells in the xenograft were isolated and counted. A titration of cells (30, 90 or 210 cells) were re-injected into NOD-SCID mice (n=10 per group). Tumor growth was assayed on day 84 and tumor initiating cell frequency was calculated from the tumor take rate. The control antibody treated tumors were determined to have a tumor initiating cell frequency of 1:137. Treatment with gemcitabine alone increased the CSC frequency to 1:61. In contrast, treatment with 59R1 decreased CSC frequency to 1:281 and the combination of 59R1 plus gemcitabine decreased CSC frequency to 1:675 (Figure 19C). A single asterisk indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) vs. the control antibody treated group and a double asterisk indicates a significant difference vs. the gemcitabine and control antibody treated group.

[00382] In another embodiment, a PE13 breast tumor model was used to test for reduction in cancer stem cell frequency after treatment with 59R5. PE13 breast tumors were treated with control antibody, anti-Notch2/3 59R5, taxol, or a combination of 59R5 and taxol for a period of three weeks. Antibodies were dosed at 20 mg/kg, once per week and taxol was dosed at 15 mg/kg, twice per week. Tumors from each group were harvested and processed to obtain single cell suspensions. The human tumors cells in the xenograft were isolated and counted. A titration of cells (50, 150 or 450 cells) were re-injected into NOD-SCID mice (n=10 per group). Tumor growth was assayed on day 39 and tumor initiating cell frequency was calculated from the tumor take rate. The control antibody treated tumors were determined to have a tumor initiating cell frequency of 1:70. Treatment with taxol alone increased the CSC frequency to 1:30. In contrast, treatment with 59R5 decreased CSC frequency to 1:202 and the combination of 59R5 plus taxol decreased CSC frequency to 1:382 (Figure 19D). A single asterisk indicates a statistically

significant difference ($p < 0.05$) vs. the control antibody treated group and a double asterisk indicates a significant difference vs. the taxol and control antibody treated group.

[00383] As observed in other experiments, these results indicated that 59R1 treatment of PN4 pancreatic tumors and 59R5 treatment of PE13 breast tumors reduced CSC frequency as a single agent and more dramatically, in combination with gemcitabine or taxol treatment, respectively. In contrast, treatment with taxol or gemcitabine alone, while effective at reducing tumor volume, increased the CSC frequency of treated tumors indicating that tumor initiating cells are preferentially resistant to the effects of these chemotherapeutic agents.

[00384] All publications and patents mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described method and system of the invention will be apparent to those in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those in the relevant fields are intended to be within the scope of the following claims.

SEQUENCES

Human anti-Notch2/3 antibody sequences

SEQ ID NO:1: Nucleotide sequence encoding anti-Notch2/3 IgG2 59R1 heavy chain, plus signal sequence. The sequence encoding the signal sequence is underlined.

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAG
GTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGC
TGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCT
GGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTATGCG
GATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATTTTT
TTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCT
AGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTG
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGC
CCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC
AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

59

TGA

SEQ ID NO:16: Predicted protein sequence of anti-Notch2/3 59R1 IgG2 heavy chain, plus signal sequence. The signal sequence is underlined.
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIA
SSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQ
TYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:3: Nucleotide sequence encoding anti-Notch2/3 59R1 light chain, plus signal sequence. The sequence encoding the signal sequence is underlined.
ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG
GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
CCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCG
GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCCTATTACCTTTGGC
CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO:18: Predicted protein sequence of anti-Notch2/3 59R1 light chain, plus signal sequence. The signal sequence is underlined.
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYG
ASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:5: 59R1Heavy chain CDR1
SSSGMS

SEQ ID NO:6: 59R1Heavy chain CDR2
VIASSGSNTYYADSVKG

SEQ ID NO:7: 59R1Heavy chain CDR3
GIFFAI

SEQ ID NO:8: 59R1 Light chain CDR1
RASQSVRSNYLA

SEQ ID NO:9: 59R1 Light chain CDR2
GASSRAT

SEQ ID NO:10: 59R1 Light chain CDR3
QQYSNFPI

SEQ ID NO:11: 59R1 Light chain VL of 59R1 Fab plus signal sequence. The signal sequence is underlined.
MKKTAIAIAVALAGFATVAQADIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:12: 59R1 Heavy chain VH of 59R1 Fab plus signal sequence. The signal sequence is underlined.
MKQSTIALALLPLLFTPVTKAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSV
IASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:13: 59R1 Light chain VL of 59R1 IgG antibody
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTD
FTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:14: 59R1 Heavy chain VH of 59R1 IgG antibody
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:39: 59R1 light chain VL plus mammalian signal sequence (underlined)
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK
PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG
QGTKVEIKR

SEQ ID NO:40: 59R1 heavy chain VH plus mammalian signal sequence (underlined)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP
GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIF
FAIWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:15: Nucleotide sequence encoding the heavy chain of anti-Notch2/3 59RGV IgG2 antibody (germlined variant of 59R1), plus signal sequence. The sequence encoding the signal sequence is underlined.
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTCGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCCGAG
GTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCC
TGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTCCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCTCCC
GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCAGCGGCTCCAACACCTACTACGCC
GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTG
CAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCATCTTC
TTCGCCATCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCT
TCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTG
ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTGGTGACAGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGAC
CACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAGTGC
CCTCCTTGCCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCT
AAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC
CACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGGC
CTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAG
GTGTACACCCTGCCTCCATCCAGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT
CTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCT
GAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTAC

TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGCAAG
TAG

SEQ ID NO:2: Predicted protein sequence of the heavy chain of anti-Notch2/3 59RGV (germlined variant of 59R1), plus signal sequence. The signal sequence is underlined.
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIA
SSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQ
TYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:17: Nucleotide sequence of the anti-Notch2/3 59RGV antibody (germlined variant of 59R1), plus signal sequence. The sequence encoding the signal sequence is underlined.
ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACACTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC
CTGAGCTGCAGGCGGGCCTCCCAGTCCGTGCGGTCCAACTACCTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCCGGACAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCCGGGCTACCGGCATC
CCTGCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTG
GAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTCCAACTTCCCTATCACCTTC
GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTC
CCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC
TTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAAC
TCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACC
CTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC
CAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAG

SEQ ID NO:4: Predicted protein sequence of the light chain of anti-Notch2/3 59RGV antibody (germlined variant of 59R1), plus signal sequence. The signal sequence is underlined.
MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:19: 59R1 Light chain VL of 59RGV antibody (germlined variant of 59R1)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:20: 59R1 Heavy chain VH of 59RGV antibody (germlined variant of 59R1)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:22 (alternative heavy chain CDR3)
SIFYPT

SEQ ID NO:23 (alternative heavy chain CDR3)
SSFFAS

SEQ ID NO:24 (alternative heavy chain CDR3)
SSFYAS

SEQ ID NO:25 (alternative heavy chain CDR3)
SSFFAT

SEQ ID NO:26 (alternative heavy chain CDR3)
SIFYPS

SEQ ID NO:27(alternative heavy chain CDR3)
SSFFAN

SEQ ID NO:30 (heavy chain CDR3 consensus sequence):
(G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N)

SEQ ID NO:47: 59R5 Light Chain nucleotide sequence (without signal sequence)
GACATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCCACACTGTCCCTGTCTCCCGGCGAGAGAGCCACC
CTGAGCTGTCGGGCCTCCCAGTCCGTGCGGTCCAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG
CCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCAGGGCTACCGGCGTGCCT
GCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAG
CCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTCCAACTTCCCTATCACCTTCGGC
CAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCC
CCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTC
TACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCC
CAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTG
ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG
GGCCTGTCCTCTCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO:48: 59R5 Heavy chain nucleotide sequence (without signal sequence)
GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCA
CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCCGCCTCCACCAAGGGC
CCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTG
GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCC
CTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTG
TCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTG
GACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAG
TGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAG
CCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC
GCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCTGTGCTG
ACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
GGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCT
CAGGTCTACACCCTGCCTCCTAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAG
CCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTG
TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGC
AAG
SEQ ID NO:49: 59R5 Heavy chain
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:50: 59R5 Heavy chain variable region
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSSAST

SEQ ID NO:51: 59R5 Heavy chain CDR3
SIFYTT

SEQ ID NO:52: Variant 59R1 Heavy chain variable region
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPTWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:53: Variant 59R1 Heavy chain variable region
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFASWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:54: Variant 59R1 Heavy chain variable region
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFYASWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:55: Variant 59R1 Heavy chain variable region
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFATWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:56: Variant 59R1 Heavy chain variable region
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPSWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:57: Variant 59R1 Heavy chain variable region
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFANWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:58: 59R5 Heavy chain variable region nucleotide sequence (without signal sequence)
GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCA
CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCCGCCTCCACC

SEQ ID NO:59: 59R1 Light chain variable region nucleotide sequence (without signal sequence)
GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
CCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCG
GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCCTATTACCTTTGGC
CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGT

SEQ ID NO:60: 59R1 Heavy chain variable region nucleotide sequence (without signal sequence)
CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTG

AGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTAT
GCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATT
TTTTTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCC

Human Notch-related sequences:

SEQ ID NO:21: Notch2(EGF1-12) Fc fusion protein amino acid sequence
MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGEYCQHRDPCEKN
RCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDTYECTCQVGFTGKEC
QWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCETDVNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGF
TGQYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTGDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNC
RCPPQWTGQFCTEDVDECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCID
RVASFSCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNP
CEHAGKCVNTDGAFHCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELGRAD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:28 (potential component of 59R1 binding site within EGF10 of human Notch2): HKGAL

SEQ ID NO:29 (site within human Notch3 EGF9 that corresponds to the potential component of 59R1 binding site within human Notch2 EGF10): HEDAI

SEQ ID NO:45: hNotch1
Amino Acids 1-1732 Extracellular domain. (underlined)
Amino Acids 372-414 EGF repeat 10 (double underlined and italicized)
MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPRCQDPNPCLSTPCKNA
GTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCRNGGTCDLLTLTEYKCRCPPGWSGKSCQQAD
PCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVNECGQKPGLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHTGP
NCERPYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVTHECACLPGFTGQNCEENIDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCP
PEWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAACFHGATCHDRVA
SFYCECPHGRTGLLCH*LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVD*ECSLGANPCEHA
GKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCICMPGYEGVHCEVNTDECASS
PCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLCQYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDID
ECDPDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHHCETNINECSSQPCRHGGTCQDRDNAYLCFCLKGTTGPNCE
INLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPEGYHD
PTCLSEVNECNSNPCVHGACRDSLNGYKCDCDPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCRE
GFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTCIDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYES
FSCVCPTGWQGQTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTHGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCT
DGINTAFCDCLPGFRGTFCEEDINECASDPCRNGANCTDCVDSYTCTCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFN
GGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQHDVNECDSQPCLHGGTCQDGCGSYRCTCPQGYTGPNCQNLVHWCDS
SPCKNGGKCWQTHTQYRCECPSGWTGLYCDVPSVSCEVAAQRQGVDVARLCQHGGLCVDAGNTHHCRCQAG
YTGSYCEDLVDECSPSPCQNGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVNCSEEIDECLSHPCQNGGTCLDLPNTYKC
SCPRGTQGVHCEINVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDA
RGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPCKNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDA
RTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTCLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKF
NGLLCHILDYSFGGGAGRDIPPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCT
QSLQCWKYFSDGHCDSQCNSAGCLFDGFDCQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCA
EHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKR
AAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPMDVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFLG

ALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMYVAAAAFVLLFFVGCGVLLSRKRRRQHGQLWFPEGFKV
SEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNASDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEEPVVLPDLDDQTDHRQWTQQ
HLDAADLRMSAMAPTPPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQG
ASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPLHAAVSADAQGVFQILIRNRATDL
DARMHDGTTPLILAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAAVNNVDAAVVLLKNGANKDMQNN
REETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGAPLG
GTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGKKVRKPSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSGMLSPVD
SLESPHGYLSDVASPPLLPSPFQQSPSVPLNHLPGMPDTHLGIGHLNVAAKPEMAALGGGGRLAFETGPPR
LSHLPVASGTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAPSLQ
HGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQMQQQNLQPANIQQQQSLQPPPPP
PQPHLGVSSAASGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSLAVHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAAQFLTPP
SQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQWSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIPEAFK

SEQ ID NO:31: human Notch2
Amino Acids 1-1677: Extracellular domain (underlined)
Amino Acids 375-417: EGF repeat 10 (double underlined and italicized)
MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGEYCQHRDPCEKN
RCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDTYECTCQVGFTGKEC
QWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCETDVNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGF
TGQYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTGDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNC
RCPPQWTGQFCTEDVDECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCID
RVASFSCMCPEGKAGLLCH*LDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVD*ECAMANSNP
CEHAGKCVNTDGAFHCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELEINE
CQSNPCVNNGQCVDKVNRFQCLCPPGFTGPVCQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPNGYECQCATGFTGVLCE
ENIDNCDPDPCHHGQCQDGIDSYTCICNPGYMGAICSDQIDECYSSPCLNDGRCIDLVNGYQCNCQPGTSG
VNCEINFDDCASNPCIHGICMDGINRYSCVCSPGFTGQRCNIDIDECASNPCRKGATCINGVNGFRCICPE
GPHHPSCYSQVNECLSNPCIHGNCTGGLSGYKCLCDAGWVGINCEVDKNECLSNPCQNGGTCDNLVNGYRC
TCKKGFKGYNCQVNIDECASNPCLNQGTCFDDISGYTCHCVLPYTGKNCQTVLAPCSPNPCENAAVCKESP
NFESYTCLCAPGWQGQRCTIDIDECISKPCMNHGLCHNTQGSYMCECPPGFSGMDCEEDIDDCLANPCQNG
GSCMDGVNTFSCLCLPGFTGDKCQTDMNECLSEPCKNGGTCSDYVNSYTCKCQAGFDGVHCENNINECTES
SCFNGGTCVDGINSFSCLCPVGFTGSFCLHEINECSSHPCLNEGTCVDGLGTYRCSCPLGYTGKNCQTLVN
LCSRSPCKNKGTCVQKKAESQCLCPSGWAGAYCDVPNVSCDIAASRRGVLVEHLCQHSGVCINAGNTHYCQ
CPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDFIGGYRCECVPGYQGVNCEYEVDECQNQPCQNGGTCIDLVN
HFKCSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPHCLNGGQCMDRIGGYSCRCLPGFAGERCEGDINECLSNPCSSEGS
LDCIQLTNDYLCVCRSAFTGRHCETFVDVCPQMPCLNGGTCAVASNMPDGFICRCPPGFSGARCQSSCGQV
KCRKGEQCVHTASGPRCFCPSPRDCESGCASSPCQHGGSCHPQRQPPYYSCQCAPPFSGSRCELYTAPPST
PPATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINNQCDELCNTVECLF
DNFECQGNSKTCKYDKYCADHFKDNHCDQGCNSEECGWDGLDCAADQPENLAEGTLVIVVLMPPEQLLQDA
RSFLRALGTLLHTNLRIKRDSQGELMVYPYYGEKSAAMKKQRMTRRSLPGEQEQEVAGSKVFLEIDNRQCV
QDSDHCFKNTDAAAALLASHAIQGTLSYPLVSVVSESLTPERTQLLYLLAVAVVIILFIILLGVIMAKRKR
KHGSLWLPEGFTLRRDASNHKRREPVGQDAVGLKNLSVQVSEANLIGTGTSEHWVDDEGPQPKKVKAEDEA
LLSEEDDPIDRRPWTQQHLEAADIRRTPSLALTPPQAEQEVDVLDVNVRGPDGCTPLMLASLRGGSSDLSD
EDEDAEDSSANIITDLVYQGASLQAQTDRTGEMALHLAARYSRADAAKRLLDAGADANAQDNMGRCPLHAA
VAADAQGVFQILIRNRVTDLDARMNDGTTPLILAARLAVEGMVAELINCQADVNAVDDHGKSALHWAAAVN
NVEATLLLLKNGANRDMQDNKEETPLFLAAREGSYEAAKILLDHFANRDITDHMDRLPRDVARDRMHHDIV
RLLDEYNVTPSPPGTVLTSALSPVICGPNRSFLSLKHTPMGKKSRRPSAKSTMPTSLPNLAKEAKDAKGSR
RKKSLSEKVQLSESSVTLSPVDSLESPHTYVSDTTSSPMITSPGILQASPNPMLATAAPPAPVHAQHALSF
SNLHEMQPLAHGASTVLPSVSQLLSHHHIVSPGSGSAGSLSRLHPVPVPADWMNRMEVNETQYNEMFGMVL
APAEGTHPGIAPQSRPPEGKHITTPREPLPPIVTFQLIPKGSIAQPAGAPQPQSTCPPAVAGPLPTMYQIP
EMARLPSVAFPTAMMPQQDGQVAQTILPAYHPFPASVGKYPTPPSQHSYASSNAAERTPSHSGHLQGEHPY
LTPSPESPDQWSSSSPHSASDWSDVTTSPTPGGAGGGQRGPGTHMSEPPHNNMQVYA

SEQ ID NO:32: human Notch3

Amino Acids 1-1640: Extracellular domain (underlined)
Amino Acids 351-393: EGF repeat 9 (double underlined and italicized)
MGPGARGRRRRRRPMSPPPPPPPVRALPLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQLPSREAACLCPPGW
VGERCQLEDPCHSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCPRGFRGPDCSLPDPCLSSPCAHGARCSVGPDGRF
LCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCR
QSGDLTYDCACLPGFEGQNCEVNVDDCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNA
CHNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPMGKTGLLCH*LDDAC*
*VSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDE*CSIGANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGP
RCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIGQFTCICMAGFTGTYCEVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPS
GFSGSTCQLDVDECASTPCRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDGIASFSC
ACAPGYTGTRCESQVDECRSQPCRHGGKCLDLVDKYLCRCPSGTTGVNCEVNIDDCASNPCTFGVCRDGIN
RYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRCLCPPGSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICY
DAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPCRAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCE
HGGRCESAPGQLPVCSCPQGWQGPRCQQDVDECAGPAPCGPHGICTNLAGSFSCTCHGGYTGPSCDQDIND
CDPNPCLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPGYGGFHCEQ
DLPDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCLHGGVCSAAHPGFRCTCLESFTG
PQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGWSGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDED
SSHYCVCPEGRTGSHCEQEVDPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGS
CIDLVARYLCSCPPGTLGVLCEINEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYTGLRCEADIN
ECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHGGQCRPSPGPGGGLTFTCHCA
QPFWGPRCERVARSCRELQCPVGVPCQQTPRGPRCACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNASCAAAPCLHGGS
CRPAPLAPFFRCACAQGWTGPRCEAPAAAPEVSEEPRCPRAACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLS
VGDPWRQCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADGRCDQGCNTE
ECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRTSLRFRLDAHGQAMVFPYHRPS
PGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEP
LEPPEPSVPLLPLLVAGAVLLLVILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDALGM
KNMAKGESLMGEVATDWMDTECPEAKRLKVEEPGMGAEEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPAMALTPPQGDA
DADGMDVNVRGPDGFTPLMLASFCGGALEPMPTEEDEADDTSASIISDLICQGAQLGARTDRTGETALHLA
ARYARADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRTPLHTAVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAARLA
VEGMVEELIASHADVNAVDELGKSALHWAAAVNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEAA
KLLLDHFANREITDHLDRLPRDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPPGAFLPGLKAAQSG
SKKSRRPPGKAGLGPQGPRGRGKKLTLACPGPLADSSVTLSPVDSLDSPRPFGGPPASPGGFPLEGPYAAA
TATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNPVAVPLDWARLPPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTP
VSPQERPPPYLAVPGHGEEYPVAGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPSPPSLSDWSESTPS
PATATGAMATTTGALPAQPLPLSVPSSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA

SEQ ID NO:46: hNotch4
Amino Acids 1-1444 Extracellular domain (underlined)
Amino Acids 392-434 EGF repeat 10 (double underlined and italicized)
MQPPSLLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCGSFPEPCANGGTCLSLSLGQGTCQCAPGFLGETCQFPDPCQNA
QLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLEDPCPPSFCSKRGRCHIQASGRPQ
CSCMPGWTGEQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACERDVNECFQDPGPCPKGTSCHN
TLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPPRGCSNGGTCQLMPEKDSTFHLCLCPPGFIGPDCEVNPDNCVSHQ
CQNGGTCQDGLDTYTCLCPETWTGWDCSEDVDECETQGPPHCRNGGTCQNSAGSFHCVCVSGWGGTSCEEN
LDDCIAATCAPGSTCIDRVGSFSCLCPPGRTGLLCH*LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSG*
*PTCHQDLDE*CLMAQQGPSPCEHGGSCLNTPGSFNCLCPPGYTGSRCEADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATF
HCLCPPGLEGQLCEVETNECASAPCLNHADCHDLLNGFQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQD
QPGAFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCPVGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCQPKQI
CKDQKDKANCLCPDGSPGCAPPEDNCTCHHGHCQRSSCVCDVGWTGPECEAELGGCISAPCAHGGTCYPQP
SGYNCTCPTGYTGPTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGGYYCTCPPSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGGT
CVNRPGTFSCLCAMGFQGPRCEGKLRPSCADSPCRNRATCQDSPQGPRCLCPTGYTGGSCQTLMDLCAQKP
CPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSGPSYFCHCPPGFQ
GSLCQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGYDGQNCSKELDACQSQPCHNHGTCTPKPGGFHCAC

PPGFVGLRCEGDVDECLDQPCHPTGTAACHSLANAFYCQCLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATA
GSPLGFICHCPKGFEGPTCSHRAPSCGFHHCHHGGLCLPSPKPGFPPRCACLSGYGGPDCLTPPAPKGCGP
PSPCLYNGSCSETTGLGGPGFRCSCPHSSPGPRCQKPGAKGCEGRSGDGACDAGCSGPGGNWDGGDCSLGV
PDPWKGCPSHSRCWLLFRDGQCHPQCDSEECLFDGYDCETPPACTPAYDQYCHDHFHNGHCEKGCNTAECG
WDGGDCRPEDGDPEWGPSLALLVVLSPPALDQQLFALARVLSLTLRVGLWVRKDRDGRDMVYPYPGARAEE
KLGGTRDPTYQERAAPQTQPLGKETDSLSAGFVVVMGVDLSRCGPDHPASRCPWDPGLLLRFLAAMAAVGA
LEPLLPGPLLAVHPHAGTAPPANQLPWPVLCSPVAGVILLALGALLVLQLIRRRRREHGALWLPPGFTRRP
RTQSAPHRRRPPLGEDSIGLKALKPKAEVDEDGVVMCSGPEEGEEVGQAEETGPPSTCQLWSLSGGCGALP
QAAMLTPPQESEMEAPDLDTRGPDGVTPLMSAVCCGEVQSGTFQGAWLGCPEPWEPLLDGGACPQAHTVGT
GETPLHLAARFSRPTAARRLLEAGANPNQPDRAGRTPLHAAVAADAREVCQLLLRSRQTAVDARTEDGTTP
LMLAARLAVEDLVEELIAAQADVGARDKWGKTALHWAAAVNNARAARSLLQAGADKDAQDNREQTPLFLAA
REGAVEVAQLLLGLGAARELRDQAGLAPADVAHQRNHWDLLTLLEGAGPPEARHKATPGREAGPFPRARTV
SVSVPPHGGGALPRCRTLSAGAGPRGGGACLQARTWSVDLAARGGGAYSHCRSLSGVGAGGGPTPRGRRFS
AGMRGPRPNPAIMRGRYGVAAGRGGRVSTDDWPCDWVALGACGSASNIPIPPPCLTPSPERGSPQLDCGPP
ALQEMPINQGGEGKK

SEQ ID NO:33: Polynucleotide sequence encoding human Notch2 EGF 1-12
ATGCCCGCCCTGCGCCCCGCTCTGCTGTGGGCGCTGCTGGCGCTCTGGCTGTGCTGCGCG
GCCCCCGCGCATGCATTGCAGTGTCGAGATGGCTATGAACCCTGTGTAAATGAAGGAATG
TGTGTTACCTACCACAATGGCACAGGATACTGCAAATGTCCAGAAGGCTTCTTGGGGGAA
TATTGTCAACATCGAGACCCCTGTGAGAAGAACCGCTGCCAGAATGGTGGGACTTGTGTG
GCCCAGGCCATGCTGGGGAAAGCCACGTGCCGATGTGCCTCAGGGTTTACAGGAGAGGAC
TGCCAGTACTCAACATCTCATCCATGCTTTGTGTCTCGACCCTGCCTGAATGGCGGCACA
TGCCATATGCTCAGCCGGGATACCTATGAGTGCACCTGTCAAGTCGGGTTTACAGGTAAG
GAGTGCCAATGGACGGATGCCTGCCTGTCTCATCCCTGTGCAAATGGAAGTACCTGTACC
ACTGTGGCCAACCAGTTCTCCTGCAAATGCCTCACAGGCTTCACAGGGCAGAAATGTGAG
ACTGATGTCAATGAGTGTGACATTCCAGGACACTGCCAGCATGGTGGCACCTGCCTCAAC
CTGCCTGGTTCCTACCAGTGCCAGTGCCCTCAGGGCTTCACAGGCCAGTACTGTGACAGC
CTGTATGTGCCCTGTGCACCCTCACCTTGTGTCAATGGAGGCACCTGTCGGCAGACTGGT
GACTTCACTTTTGAGTGCAACTGCCTTCCAGGTTTTGAAGGGAGCACCTGTGAGAGGAAT
ATTGATGACTGCCCTAACCACAGGTGTCAGAATGGAGGGGTTTGTGTGGATGGGGTCAAC
ACTTACAACTGCCGCTGTCCCCCACAATGGACAGGACAGTTCTGCACAGAGGATGTGGAT
GAATGCCTGCTGCAGCCCAATGCCTGTCAAAATGGGGGCACCTGTGCCAACCGCAATGGA
GGCTATGGCTGTGTATGTGTCAACGGCTGGAGTGGAGATGACTGCAGTGAGAACATTGAT
GATTGTGCCTTCGCCTCCTGTACTCCAGGCTCCACCTGCATCGACCGTGTGGCCTCCTTC
TCTTGCATGTGCCCAGAGGGGAAGGCAGGTCTCCTGTGTCATCTGGATGATGCATGCATC
AGCAATCCTTGCCACAAGGGGGCACTGTGTGACACCAACCCCCTAAATGGGCAATATATT
TGCACCTGCCCACAAGGCTACAAAGGGGCTGACTGCACAGAAGATGTGGATGAATGTGCC
ATGGCCAATAGCAATCCTTGTGAGCATGCAGGAAAATGTGTGAACACGGATGGCGCCTTC
CACTGTGAGTGTCTGAAGGGTTATGCAGGACCTCGTTGTGAGATGGACATCAATGAGTGC
CATTCAGACCCCTGCCAGAATGATGCTACCTGTCTGGATAAGATTGGAGGCTTCACATGT
CTGTGCATGCCAGGTTTCAAAGGTGTGCATTGTGAATTA

SEQ ID NO:34: Human Notch2 EGF 1-12 polypeptide sequence
MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGE
YCQHRDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGT
CHMLSRDTYECTCQVGFTGKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCE
TDVNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGFTGQYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTG
DFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVD
ECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASF
SCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECA
MANSNPCEHAGKCVNTDGAFHCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTC
LCMPGFKGVHCEL

SEQ ID NO:35: Human Notch1 EGF10
LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVD

SEQ ID NO:36: Human Notch2 EGF10
LDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVD

SEQ ID NO:37: Human Notch3 EGF9 (EGF9 is the EGF of human Notch3 that corresponds to EGF10 of the other Notch receptors including Notch2)
LDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVD

SEQ ID NO:38: Human Notch4 EGF10
LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLD

SEQ ID NO:41: Notch1 EGF repeat 4
QADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQ

SEQ ID NO:42: Notch2 EGF repeat 4
TDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCET

SEQ ID NO:43: Notch3 EGF repeat 4
SDVDECRVGEPCRHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCEN

SEQ ID NO:44: Notch4 EGF repeat 4
RDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACER

Applicant's or agent's file reference	International application No.
2293.049PC03	PCT/US2009/003994

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 8, 9, 36, line

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT — Further deposits are identified on an additional sheet ☐

Name of depositary institution

American Type Culture Collection

Address of depositary institution *(including postal code and country)*

10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
United States of America

Date of deposit	Accession Number
July 6, 2009	PTA-10170

C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)* — This information is continued on an additional sheet ☐

Plasmid isolated from E.coli containing human DNA insert 59R5

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer TYETTA STATON	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July1998; reprint January 2004)

AUSTRALIA

The applicant hereby gives notice that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be effected prior to the grant of a patent, or prior to the lapsing, refusal or withdrawal of the application, to a person who is a skilled addressee without an interest in the invention (Regulation 3.25(3) of the Australian Patents Regulations).

CANADA

The applicant hereby requests that, until either a Canadian patent has been issued on the basis of the application or the application has been refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, the furnishing of a sample of deposited biological material referred to in the application only be effected to an independent expert nominated by the Commissioner of Patents.

CROATIA

The applicant hereby requests that a sample of deposited biological material referred to in the application should be made available between the publication of the application and the granting of the patent to an independent expert only. Samples shall be made available only if the person requesting them undertakes, for the term during which the patent is in force, not to make them or any material derived from them available to third parties, and not to use them or any material derived from them except for experimental or research purposes, unless the applicant for or owner of the patent, as applicable, expressly waives such undertaking.

DENMARK

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent office or any person approved by the applicant in the individual case.

FINLAND

The applicant hereby requests that, until the publication of the mention of the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration of Finland or for 20 years from the date of filing if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration of Finland, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the National Board of Patents and Registration of Finland or any person approved by the applicant in the individual case.

GERMANY

The applicant herby requests that, until the grant of a patent or for 20 years from the date of filing of the application is refused or withdrawn, a sample shall only be issued to an independent expert nominated by the applicant.

ICELAND

The applicant hereby requests that, until a patent has been granted or a final decision taken by the Icelandic Patent Office concerning an application which has not resulted in a patent, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Icelandic Patent office or any person approved by the applicant in the individual case.

NORWAY

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent office or any person approved by the applicant in the individual case.

SINGAPORE

The applicant hereby requests that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be made available to an expert.

SPAIN

The applicant hereby requests that, until the publication of the mention of the grant of a Spanish patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, the biological material shall be made available as provided in Article 45 SPL only by the issue of a sample to an independent expert.

SWEDEN

The applicant hereby requests that, until the patent has been granted by the Swedish Patent and Registration Office or if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of the patent, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. The same is applied to rejected or withdrawn applications within a period of 20 years from the filing date.

SWITZERLAND

The applicant hereby requests that, the furnishing of samples to a third party may be subject to the condition that that party indicates to the depository institution its name and address for the purpose of information of the depositor and undertakes: (a) not to make available the deposited culture or a culture derived from it to a third party; (b) not to use the culture outside the purview of the law; (c) to produce, in case of a dispute, evidence that the obligations under items (a) and (b) have not been violated.

THE FORMER YUGOSLAV REPUBLIC OF MACEDONIA

The applicant hereby requests that, the furnishing of samples to a third party may be subject to the condition that that party: (a) has a right to demand that a sample of the viable biological or microbiological material be made available; (b) has undertaken to ensure that the applicant does not authorize access to the sample of the deposited viable biological or microbiological material to any third party before the expiry of the prescribed period of validity of the patent.

UNITED KINGDOM

The applicant hereby requests that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be made available to an expert.

EUROPEAN PATENT OFFICE

The applicant hereby requests that, until the publication of the mention of the grant of a European patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or deemed to be withdrawn, the biological material shall be made available as provided in Rule 28(3) EPC only by the issue of a sample to expert nominated by the requester (Rule 28(4) EPC).

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch2, wherein the antibody specifically binds to EGF repeat 10 of human Notch2.

2. The antibody of claim 1, which is an antagonist of human Notch2.

3. The antibody of claim 2, which inhibits binding of a ligand to human Notch2.

4. The antibody of claim 3, wherein the ligand is DLL4, JAG1, and/or JAG2.

5. The antibody of any one of claims 2-4, which inhibits signaling of human Notch2.

6. The antibody of any one of claims 1-5, which binds human Notch2 with a K_D of about 1 nM or less.

7. The antibody of any one of claims 1-6, which does not bind to any region of human Notch2 outside of the EGF repeat 10.

8. The antibody of any one of claims 1-7, wherein the antibody binds to at least part of the sequence HKGAL (SEQ ID NO:28) within the Notch2 EGF repeat 10.

9. The antibody of any one of claims 1-8, which further specifically binds to at least one additional human Notch receptor.

10. The antibody of claim 9, which comprises an antigen binding site that binds the non-ligand binding region of the extracellular domain of both the human Notch2 and the additional human Notch receptor(s).

11. The antibody of claim 10, wherein the additional human Notch receptor is human Notch3.

12. The antibody of any one of claims 1-8, which further specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch3, wherein the antibody specifically binds to EGF repeat 9 of human Notch3.

13. The antibody of claim 12, which comprises an antigen-binding site that binds both the EGF repeat 9 of human Notch3 and the EGF repeat 10 of Notch2.

14. The antibody of claim 12 or 13, which is an antagonist of human Notch3.

15. The antibody of claim 14, which inhibits binding of a ligand to human Notch3.

16. The antibody of claim 15, wherein the ligand is DLL4, JAG1, and/or JAG2.

17. The antibody of any one of claims 14-16, which inhibits signaling of human Notch3.

18. The antibody of any one of claims 12-17, which binds human Notch3 with a K_D of about 1 nM or less.

19. The antibody of any one of claims 12-18, which does not bind to any region of human Notch3 outside of EGF repeat 9.

20. An isolated antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch3, wherein the antibody specifically binds to EGF repeat 9 of human Notch3.

21. The antibody of claim 20, which is an antagonist of human Notch3.

22. The antibody of claim 21, which inhibits binding of a ligand to human Notch3.

23. The antibody of claim 22, wherein the ligand is DLL4, JAG1, and/or JAG2.

24. The antibody of any one of claims 21-23, which inhibits signaling of human Notch3.

25. The antibody of any one of claims 20-24, which binds human Notch3 with a K_D of about 1 nM or less.

26. The antibody of any one of claims 20-25, which does not bind to any region of human Notch3 outside of EGF repeat 9.

27. The antibody of any one of claims 20-26, wherein the antibody binds to at least part of the sequence HEDAI (SEQ ID NO:29) within the Notch3 EGF repeat 9.

28. The antibody of any one of claims 20-27, which further specifically binds to EGF repeat 10 of at least one additional human Notch receptor.

29. The antibody of claim 28, which comprises an antigen binding site that binds the non-ligand binding region of the extracellular domain of both the human Notch3 and the additional human Notch receptor(s).

30. An antibody encoded by the polynucleotide deposited with the ATCC as 59R1 or PTA-9547.

31. An antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises

(a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions;

(b) a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and

(c) a heavy chain CDR3 comprising either SIFYTT (SEQ ID NO:51) or GIFFAI (SEQ ID NO:7), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions.

32. The antibody of claim 31, wherein the heavy chain CDR1 comprises SSSGMS (SEQ ID NO:5), the heavy chain CDR2 comprises VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and the heavy chain CDR3 comprises SIFYTT (SEQ ID NO:51).

33. An antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and a heavy chain CDR3 comprising (G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30).

34. The antibody of claim 33, wherein the heavy chain CDR3 is selected from the group consisting GIFFAI (SEQ ID NO:7), SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26), and SSFFAN (SEQ ID NO:27).

35. The antibody of any one of claims 31-34, which further comprises:

(a) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO: 8), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions;

(b) a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and

(c) a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions.

36. The antibody of claim 35, wherein the light chain CDR1 comprises RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO: 8), the light chain CDR2 comprises GASSRAT (SEQ ID NO:9), and/or the light chain CDR3 comprises QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

37. An antibody that specifically binds a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises:

(a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and a heavy chain CDR3 comprising SIFYTT (SEQ ID NO:51) or GIFFAI (SEQ ID NO:7); and/or

(b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

38. The antibody of claim 37, wherein the antibody comprises:

(a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and a heavy chain CDR3 comprising SIFYTT (SEQ ID NO:51); and

(b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

39. The antibody of claim 37, wherein the antibody comprises:

(a) a heavy chain CDR1 comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and a heavy chain CDR3 comprising GIFFAI (SEQ ID NO:7); and

(b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

40. An antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3, wherein the antibody comprises:

(a) a heavy chain variable region having at least about 90% sequence identity to SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:20; and/or

(b) a heavy chain variable region having at least about 90% sequence identity to SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:19.

41. The antibody of claim 40, which comprises:

(a) a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:50 or SEQ ID NO:14; and/or

(b) a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:13.

42. The antibody of claim 41, which comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:50; and/or

(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:13.

43. The antibody of claim 41, which comprises:

(a) a polypeptide comprising SEQ ID NO:14; and/or

(b) a polypeptide comprising SEQ ID NO:13.

44. The antibody of any one of claims 31-43, which specifically binds to human Notch2.

45. The antibody of claim 44, which further specifically binds to human Notch3.

46. The antibody of any one of claims 31-43, which binds to EGF repeat 10 of human Notch2 and/or EGF repeat 9 of human Notch3.

47. An isolated antibody that competes for specific binding to human Notch2 and/or Notch3 with the antibody of any one of claims 30 to 43.

48. The antibody of any one of claims 30-43, which is an antagonist of human Notch2 and/or Notch3.

49. An isolated antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of two or more human Notch receptors, wherein if the two or more human Notch receptors comprise Notch2, Notch1, or Notch4, the antibody specifically binds to EGF10 of Notch2, Notch1, or Notch4, and if the two or more human Notch receptors comprise Notch3, the antibody binds to EGF 9 of Notch3.

50. The antibody of claim 49, wherein the antibody is an antagonist of the two or more human Notch receptors.

51. The antibody of claim 49 or 50, wherein the two or more human Notch receptors comprise both Notch1 and Notch4.

52. The antibody of any one of claims 1-51, which inhibits tumor growth.

53. The antibody of any one of claims 1-52, which is a recombinant antibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, or an antibody fragment.

54. The antibody of any one of claims 1-53, which is a bispecific antibody.

55. The antibody of any one of claims 1-53, which is a monospecific antibody.

56. The antibody of any one of claims 1-55, which is an IgG1 or IgG2 antibody.

57. A cell comprising or producing the antibody of any one of claims 1-56.

58. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 1-56.

59. A method of inhibiting Notch3 signaling in a cell comprising contacting the cell with an effective amount of the antibody of any one of claims 11-43, 45-48, or 52-56 with the cell.

60. A method of inhibiting Notch 2 signaling in a cell comprising contacting the cell with an effective amount of the antibody of any one of claims 1-19, 30-48, or 52-56 with the cell.

61. A method of inhibiting angiogenesis in a subject, comprising administering an effective amount of the antibody of any one of claims 1-48 or 52-56 to the subject.

62. The method of claim 61, which is a method of inhibiting angiogenesis by modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells.

63. The method of claim 61 or 62, wherein the angiogenesis is tumor angiogenesis.

64. A method of inhibiting tumor growth in a subject, comprising administering an effective amount of the antibody of any one of claims 1-56 to the subject.

65. A method of reducing the tumorigenicity of a tumor in a subject, comprising administering an effective amount of the antibody of any one of claims 1-56 to the subject.

66. The method of claim 65, wherein the frequency of cancer stem cells in the tumor is reduced.

67. The method of claim 64, 65, or 66, wherein the tumor is a colorectal tumor, breast tumor, pancreatic tumor or melanoma.

68. A method of treating an angiogenesis-associated disease in a subject, comprising administering an effective amount of the antibody of any one of claims 1-48 or 52-56 to the subject.

69. A method of treating cancer in a subject, comprising administering an effective amount of the antibody of any one of claims 1-56 to the subject.

70. The method of claim 69, wherein the cancer is colorectal cancer, breast cancer, pancreatic cancer, or melanoma.

86. The method of any one of claims 82 to 84, wherein the antagonist is not an antibody.

87. The method of any one of claims 82 to 86, wherein the antagonist is an antagonist of human Notch3.

88. The method of claim 87, wherein the antagonist is also an antagonist of human Notch2.

89. The method of any one of claims 82 to 88, which further comprises administering to the subject an antagonist of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) or of a VEGF receptor.

71. The method of any one of claims 61-70, further comprising administering a therapeutically effective amount of a second agent to the subject, wherein the second agent is an anti-cancer agent and/or an anti-angiogenic agent.

72. The method of claim 71, wherein the second agent is a chemotherapeutic agent.

73. The method of claim 72, wherein the chemotherapeutic agent is paclitaxel, gemcitabine, or irinotecan.

74. The method of claim 71, wherein the second agent is an antagonist of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) or of a VEGF receptor.

75. The method of claim 71, wherein the second agent is an anti-DLL4 antibody.

76. The method of any one of claims 61-75, wherein the subject is human.

77. A polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, and SEQ ID NO:49.

78. A polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of claim 77.

79. A polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:58, SEQ IDNO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:48, SEQ IDNO:47, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:15, and SEQ ID NO:17.

80. A polynucleotide that hybridizes to a polynucleotide having the sequence of SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, or SEQ ID NO:60 under stringent hybridization conditions.

81. A vector comprising the polynucleotide of any one of claims 78-80.

82. A method of inhibiting angiogenesis in a subject, comprising administering an effective amount of an antagonist of human Notch 2 and/or Notch3 to the subject.

83. The method of claim 82, which is a method of inhibiting angiogenesis by modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells.

84. The method of claim 82 or 83, wherein the angiogenesis is tumor angiogenesis.

85. The method of any one of claims 82 to 84, wherein the antagonist is an antibody.

Figure 1A

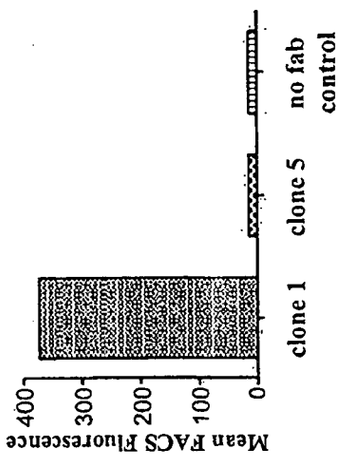


Figure 1B

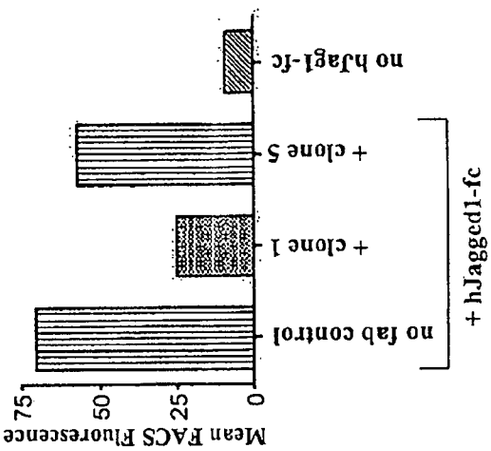


Figure 1D

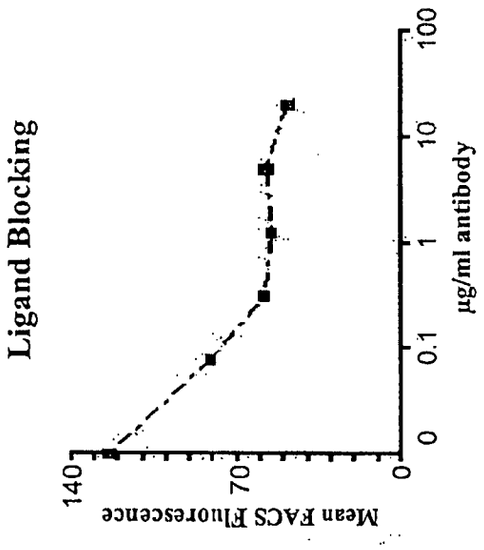


Figure 1C

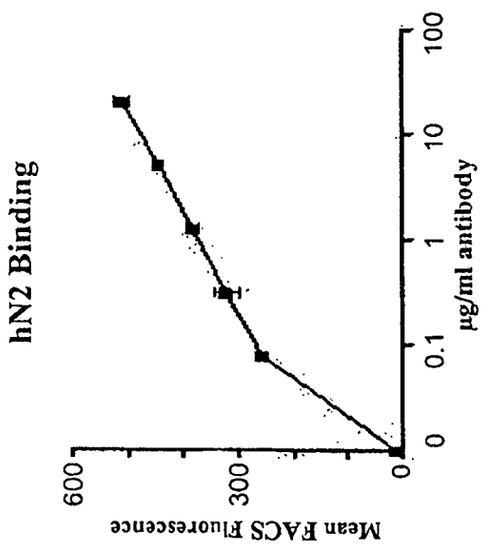
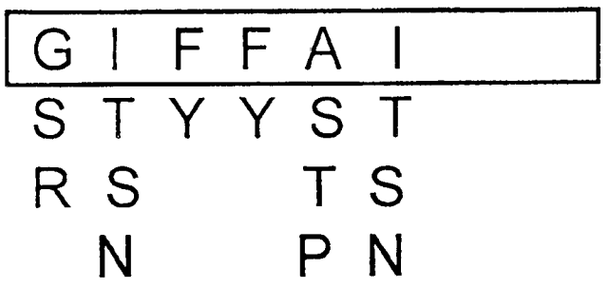


Figure 1E



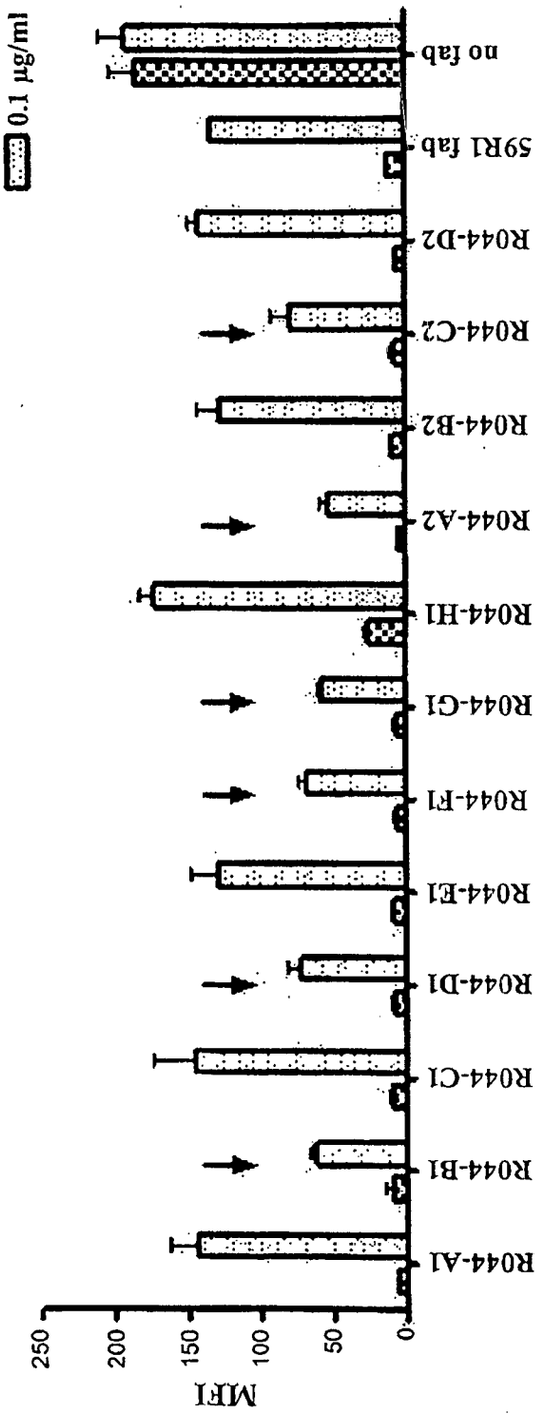

10 µg/ml
0.1 µg/ml
no fab
59R1 fab
R044-D2
R044-C2
R044-B2
R044-A2
R044-H1
R044-G1
R044-F1
R044-E1
R044-D1
R044-C1
R044-B1
R044-A1
0
50
100
150
200
250
MFI

Figure 1F

Figure 2

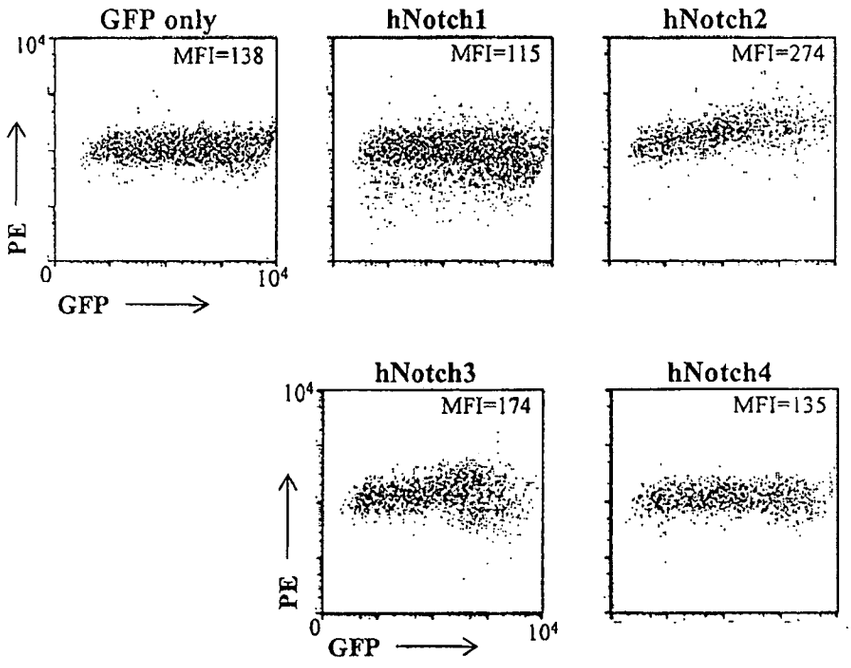
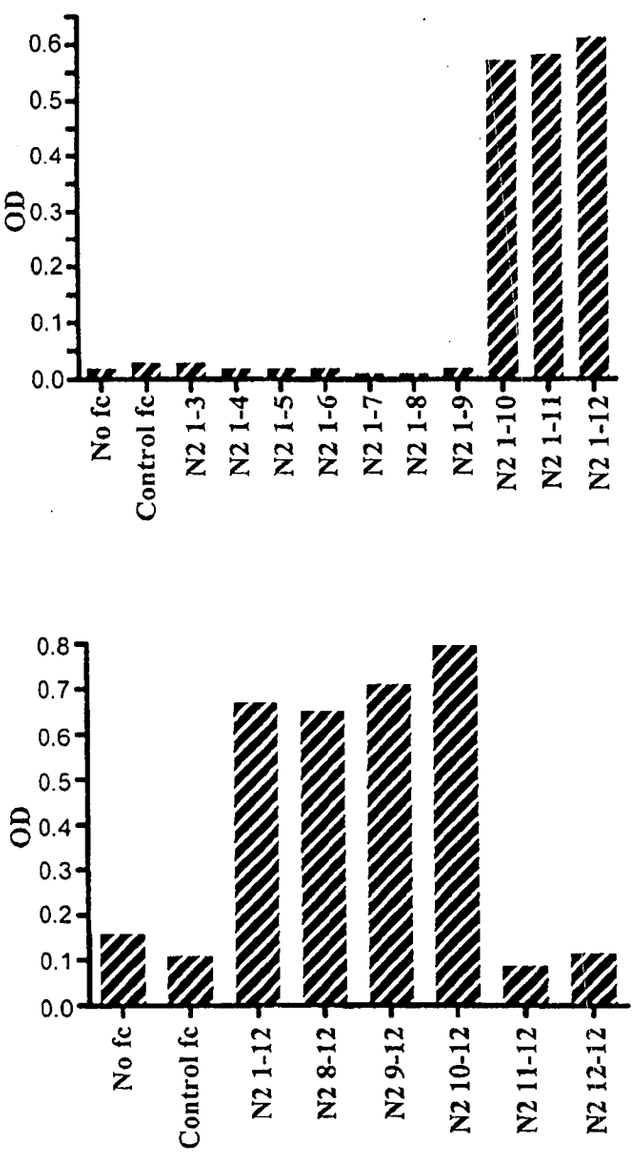

GFP only
MFI=138
hNotch1
MFI=115
hNotch2
MFI=274
hNotch3
MFI=174
hNotch4
MFI=135
PE
GFP
0
10⁴

Figure 3A


OD
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
No fc
Control fc
N2 1-3
N2 1-4
N2 1-5
N2 1-6
N2 1-7
N2 1-8
N2 1-9
N2 1-10
N2 1-11
N2 1-12
OD
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
No fc
Control fc
N2 1-12
N2 8-12
N2 9-12
N2 10-12
N2 11-12
N2 12-12

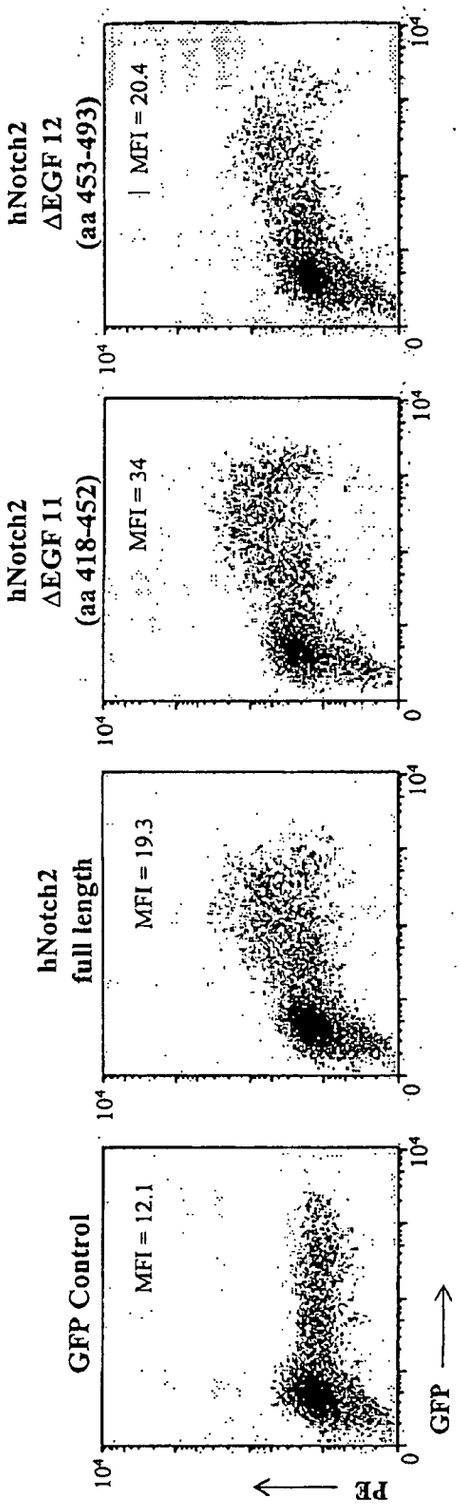

GFP Control
MFI = 12.1
hNotch2
full length
MFI = 19.3
hNotch2
ΔEGF 11
(aa 418-452)
MFI = 34
hNotch2
ΔEGF 12
(aa 453-493)
MFI = 20.4
PE
GFP
10^4
0

Figure 3B

Figure 3C

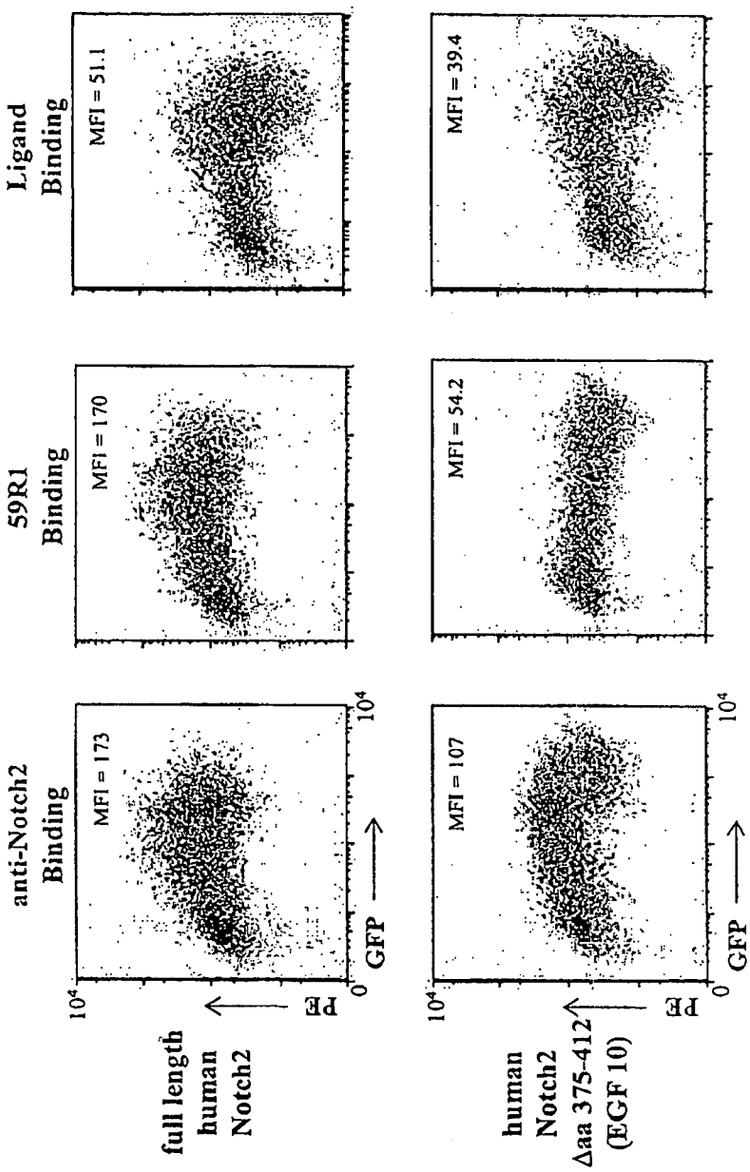

anti-Notch2 Binding
59R1 Binding
Ligand Binding
MFI = 173
MFI = 170
MFI = 51.1
MFI = 107
MFI = 54.2
MFI = 39.4
full length human Notch2
human Notch2 Δaa 375-412 (EGF 10)
PE
GFP
10^4
0

Figure 4A

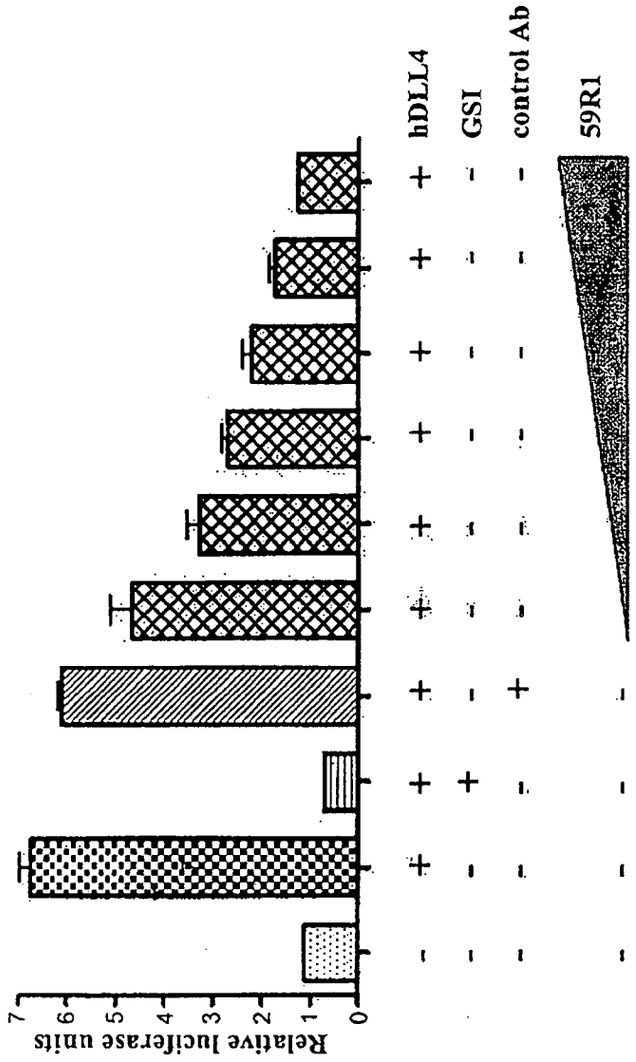

Relative luciferase units
0
1
2
3
4
5
6
7
hDLL4
GSI
control Ab
59R1

Figure 4B

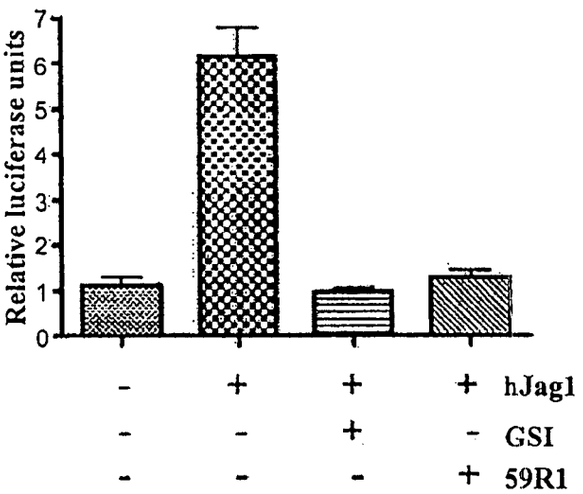


Figure 4C

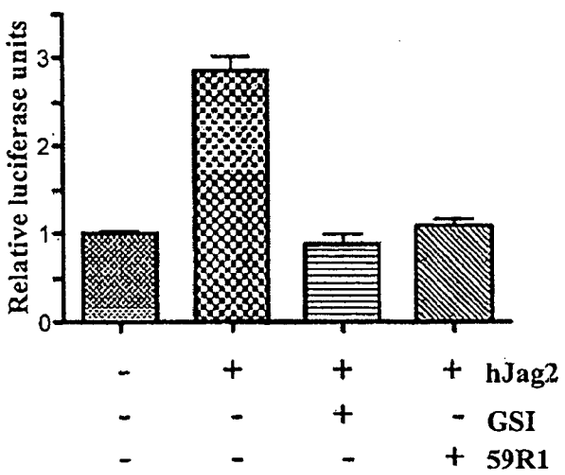


Figure 5A

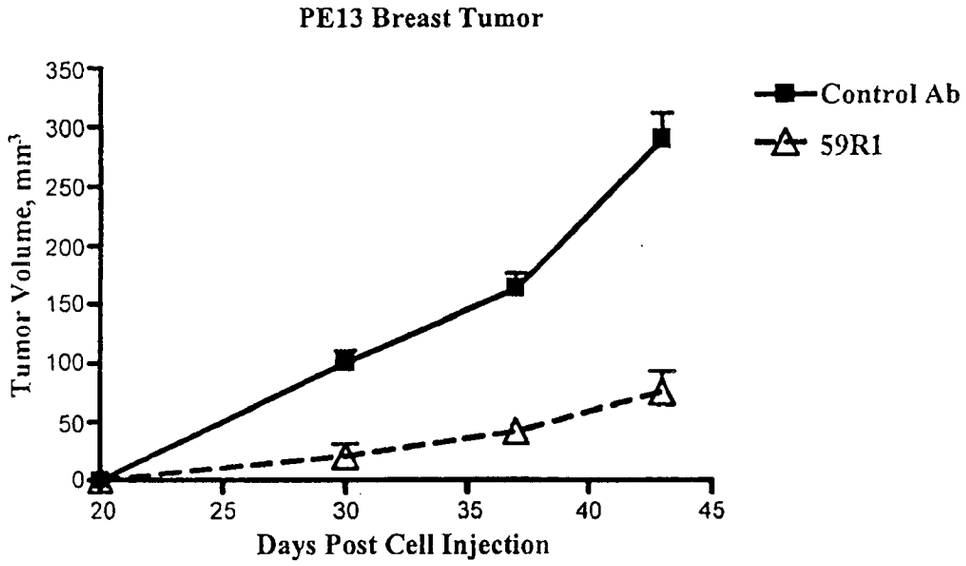

PE13 Breast Tumor
Tumor Volume, mm3
350
300
250
200
150
100
50
0
20
25
30
35
40
45
Days Post Cell Injection
Control Ab
59R1

Figure 5B

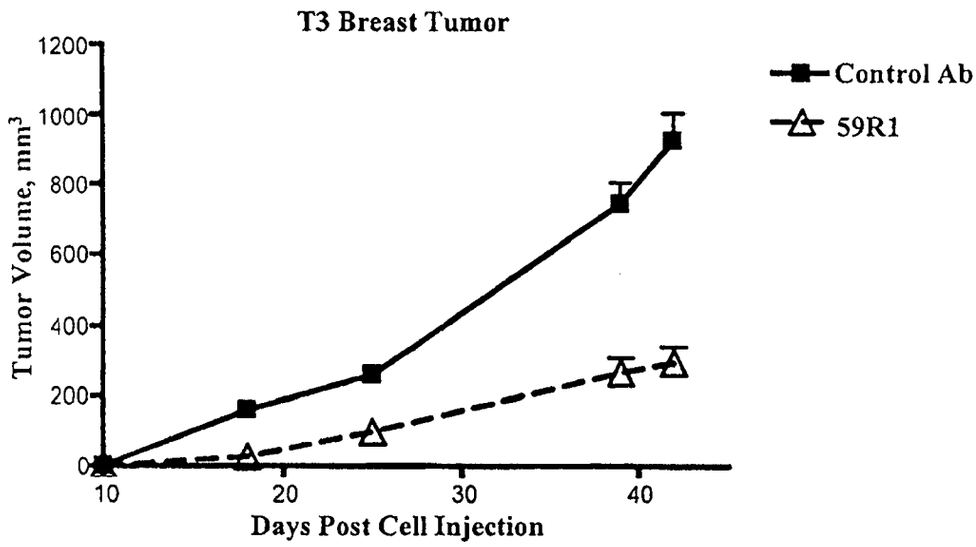
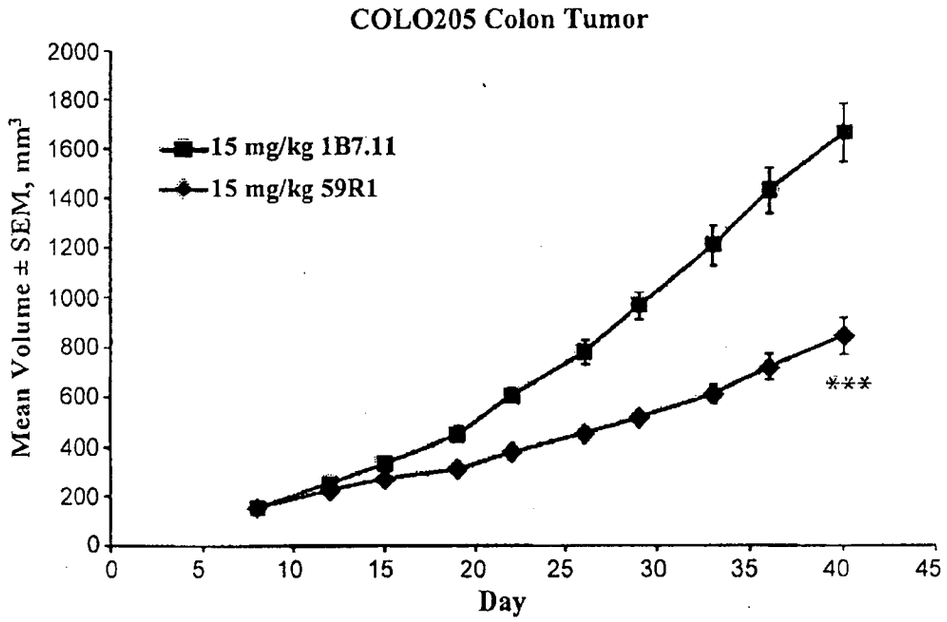
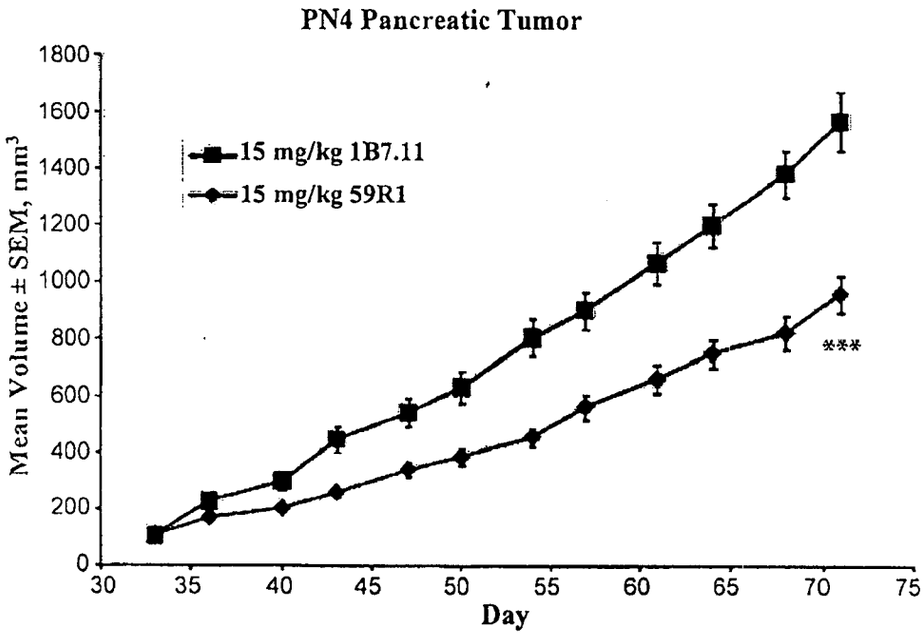

T3 Breast Tumor
Tumor Volume, mm3
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
Days Post Cell Injection
Control Ab
59R1

Figure 5C



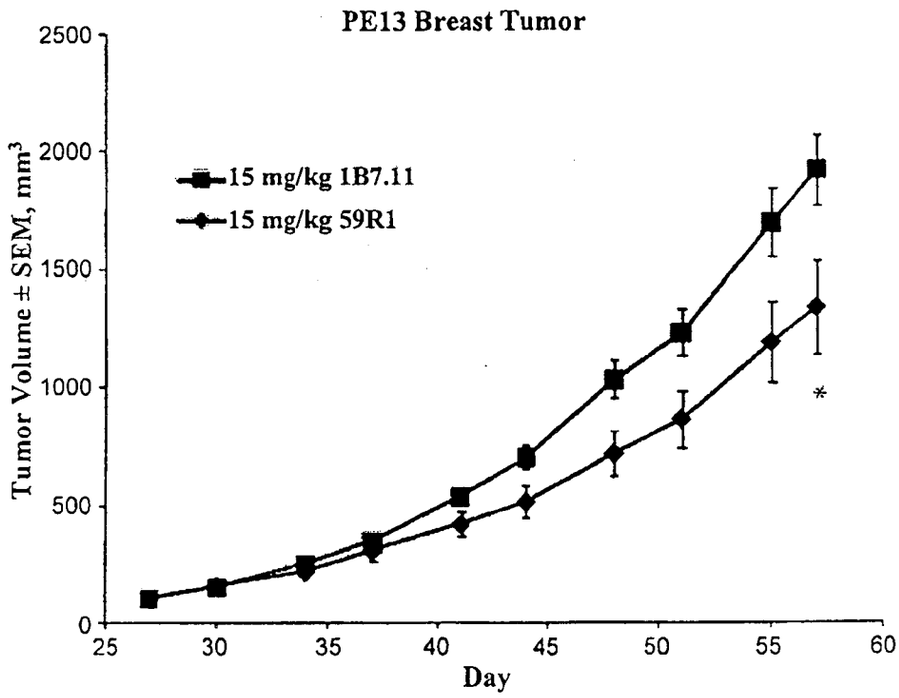
*** $p < 0.001$, 59R1 relative to 1B7.11

Figure 5D



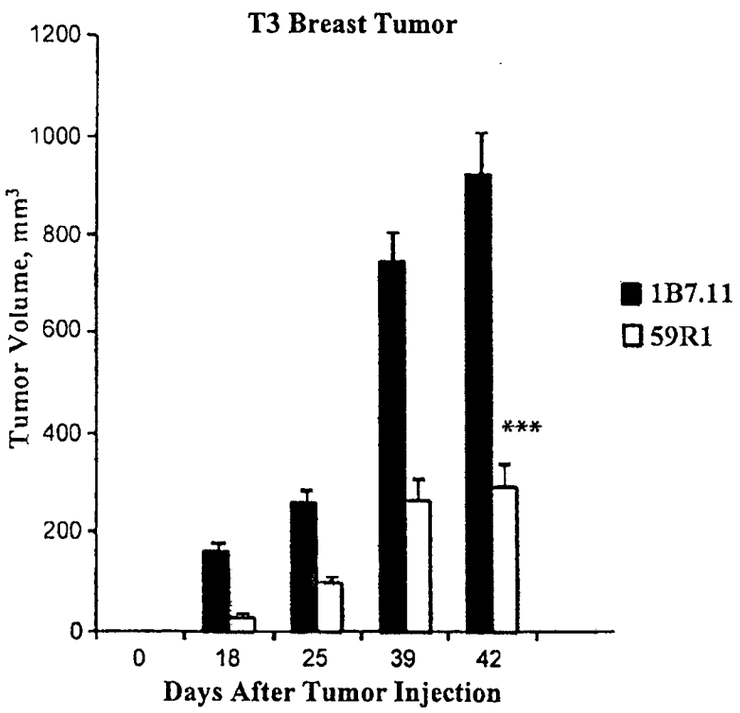
*** $p < 0.001$, 59R1 relative to 1B7.11

Figure 5E



* $p < 0.05$, 59R1 relative to 1B7.11

Figure 5F



*** p < 0.001, 59R1 relative to 1B7.11

Figure 6

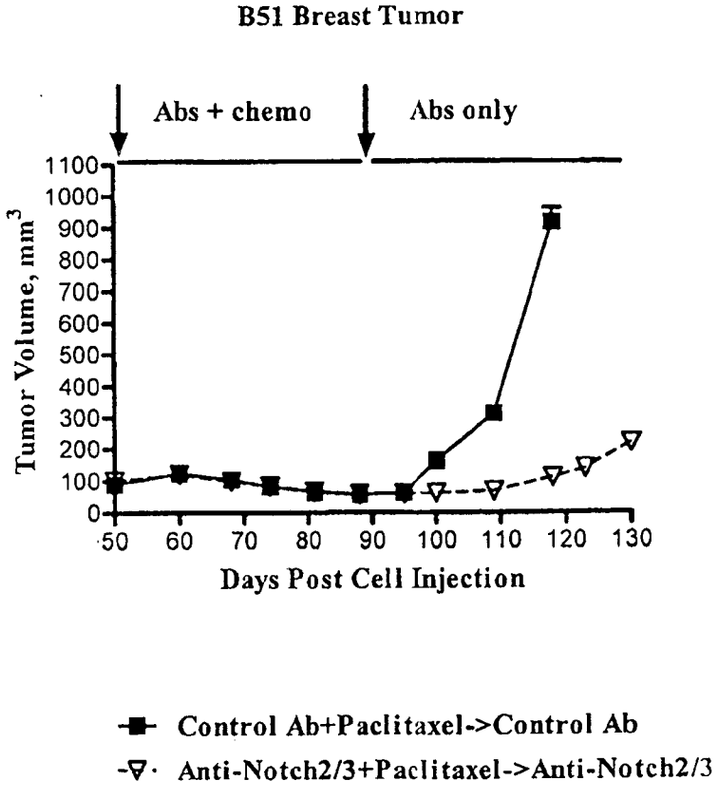

B51 Breast Tumor
Abs + chemo
Abs only
Tumor Volume, mm3
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Days Post Cell Injection
Control Ab+Paclitaxel->Control Ab
Anti-Notch2/3+Paclitaxel->Anti-Notch2/3

Figure 7

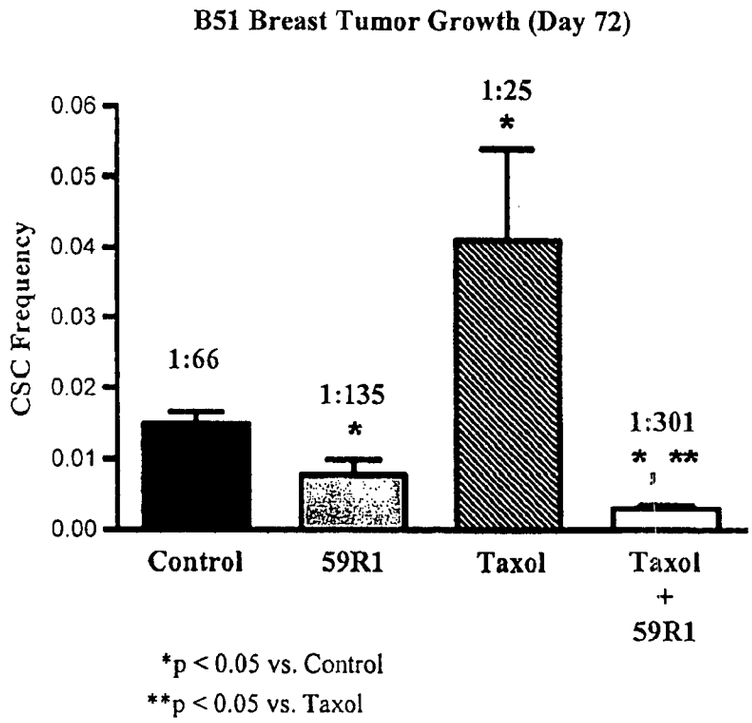

B51 Breast Tumor Growth (Day 72)
CSC Frequency
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
1:66
1:135
*
1:25
*
1:301
* **
Control
59R1
Taxol
Taxol
+
59R1
*p < 0.05 vs. Control
**p < 0.05 vs. Taxol

Figure 8

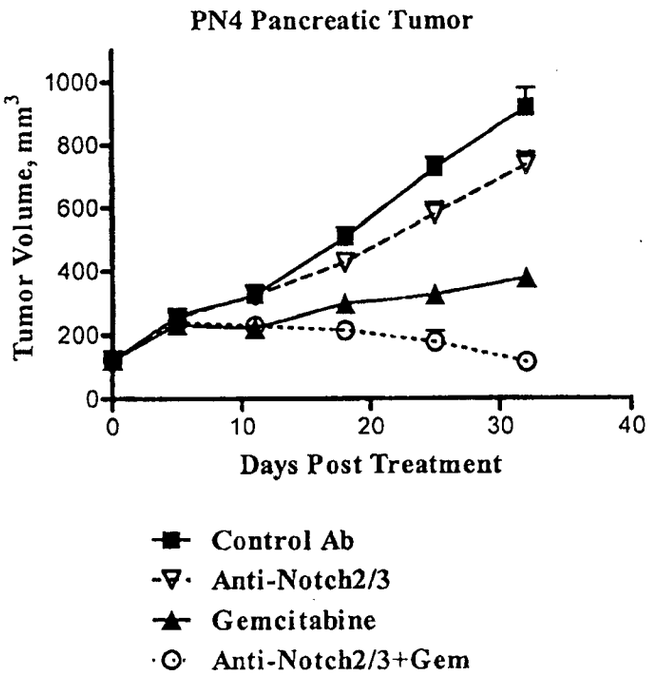

PN4 Pancreatic Tumor
Tumor Volume, mm3
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Days Post Treatment
Control Ab
Anti-Notch2/3
Gemcitabine
Anti-Notch2/3+Gem

Figure 9

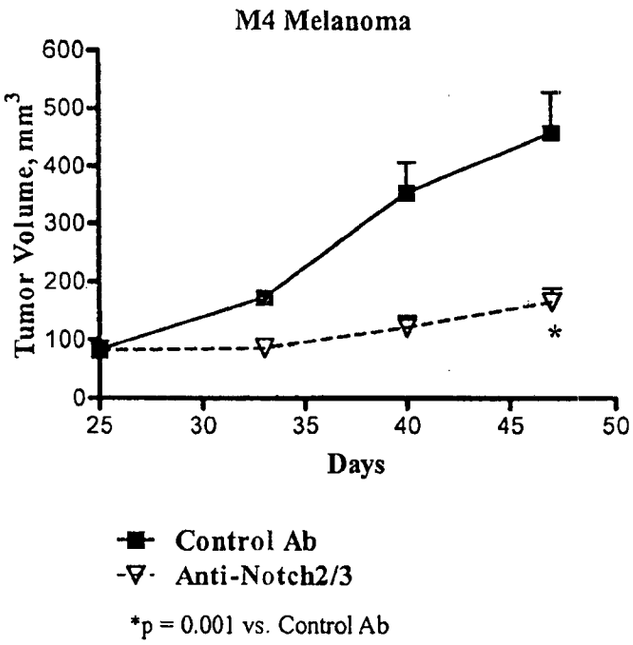
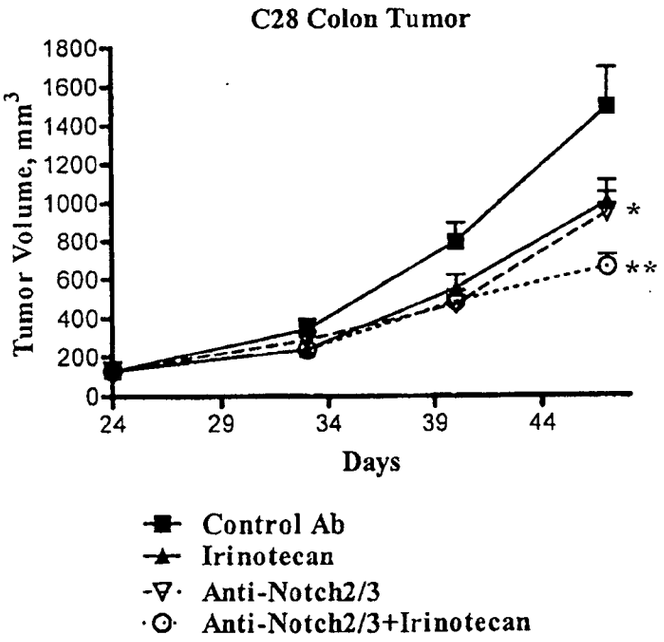

M4 Melanoma
Tumor Volume, mm3
600
500
400
300
200
100
0
25
30
35
40
45
50
Days
*
Control Ab
Anti-Notch2/3
*p = 0.001 vs. Control Ab

Figure 10



*p = 0.03 vs. Control Ab
**p = 0.01 vs. Irinotecan

Figure 11A

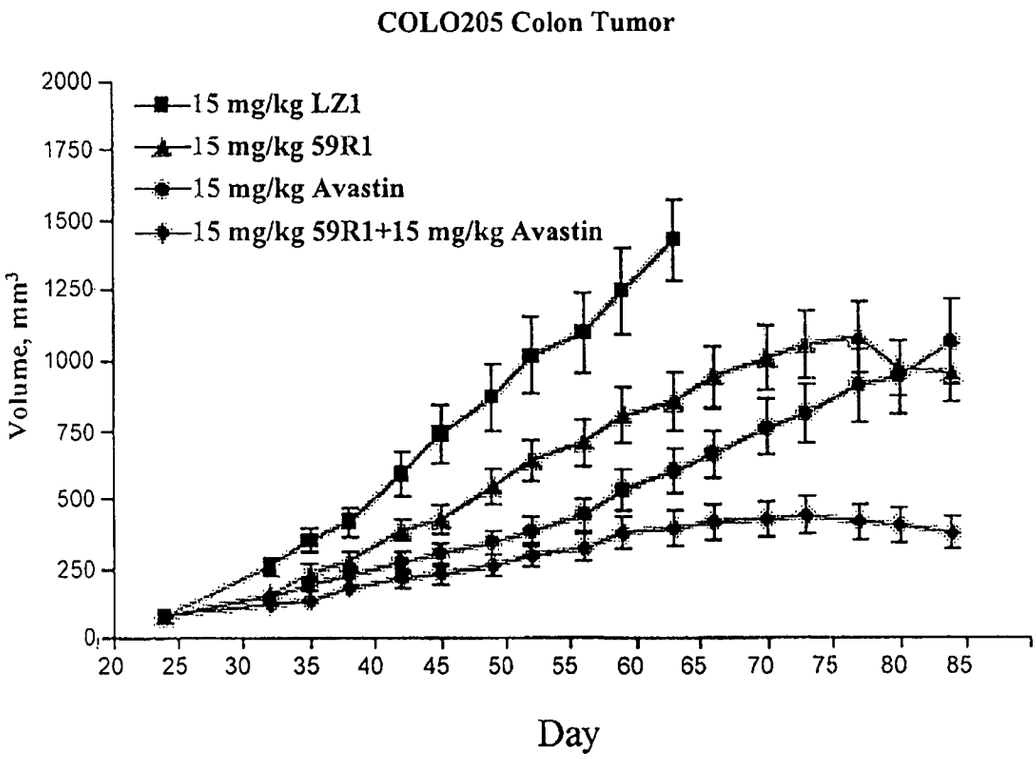

COLO205 Colon Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
15 mg/kg Avastin
15 mg/kg 59R1+15 mg/kg Avastin
Volume, mm3
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
Day

Figure 11B

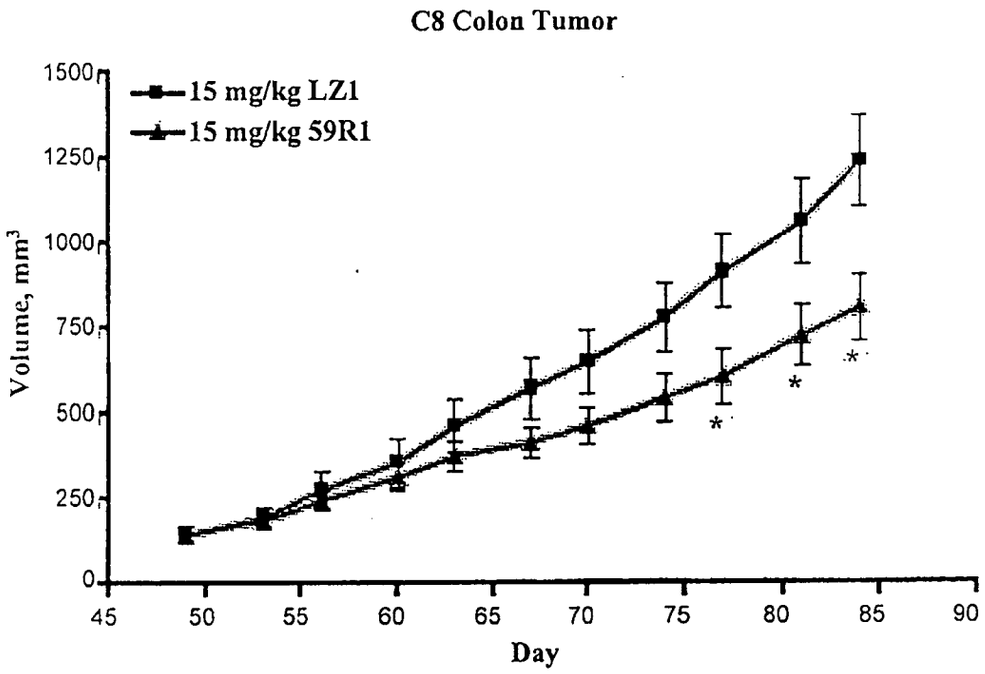

C8 Colon Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
1500
1250
1000
750
500
250
0
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
Day
*
*
*

Figure 11C

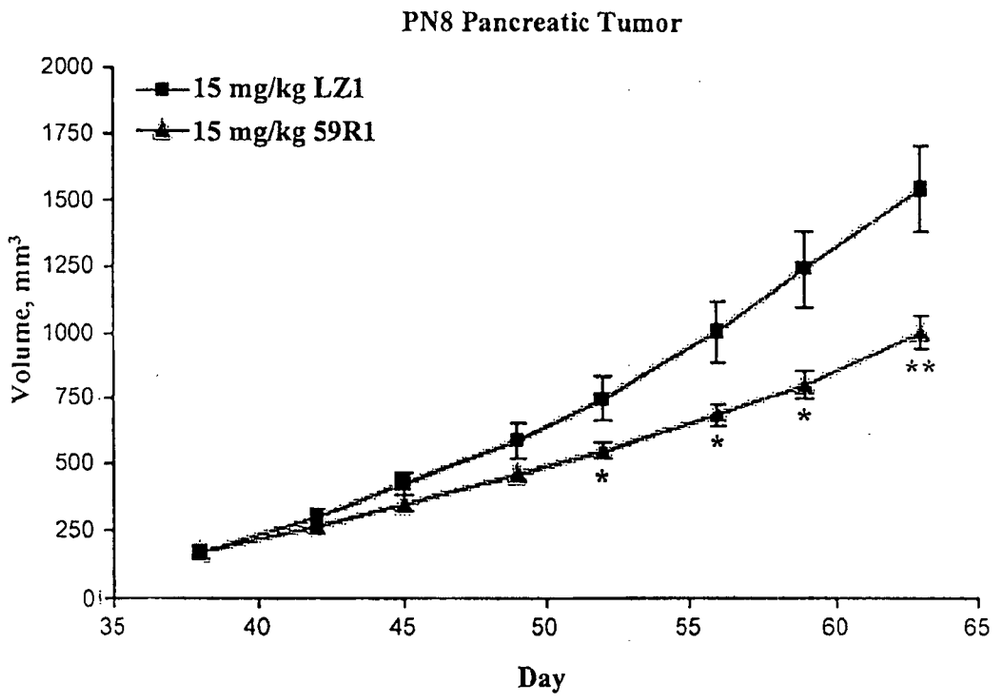

PN8 Pancreatic Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
35
40
45
50
55
60
65
Day
*
*
*
**

Figure 11D

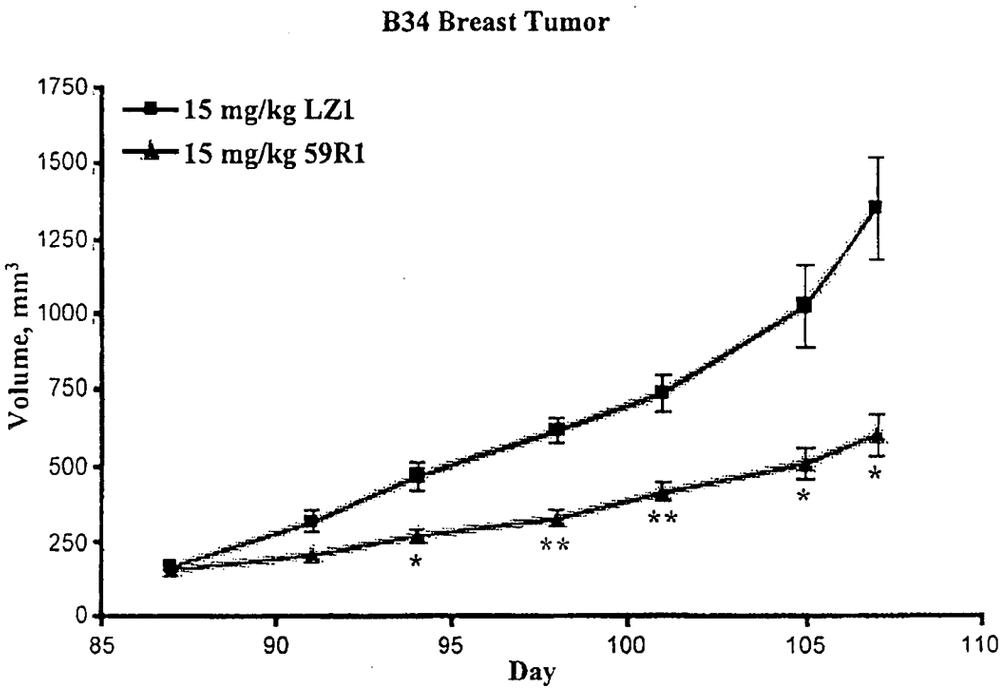

B34 Breast Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
Day
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
85
90
95
100
105
110
*
**
**
*
*

Figure 11E

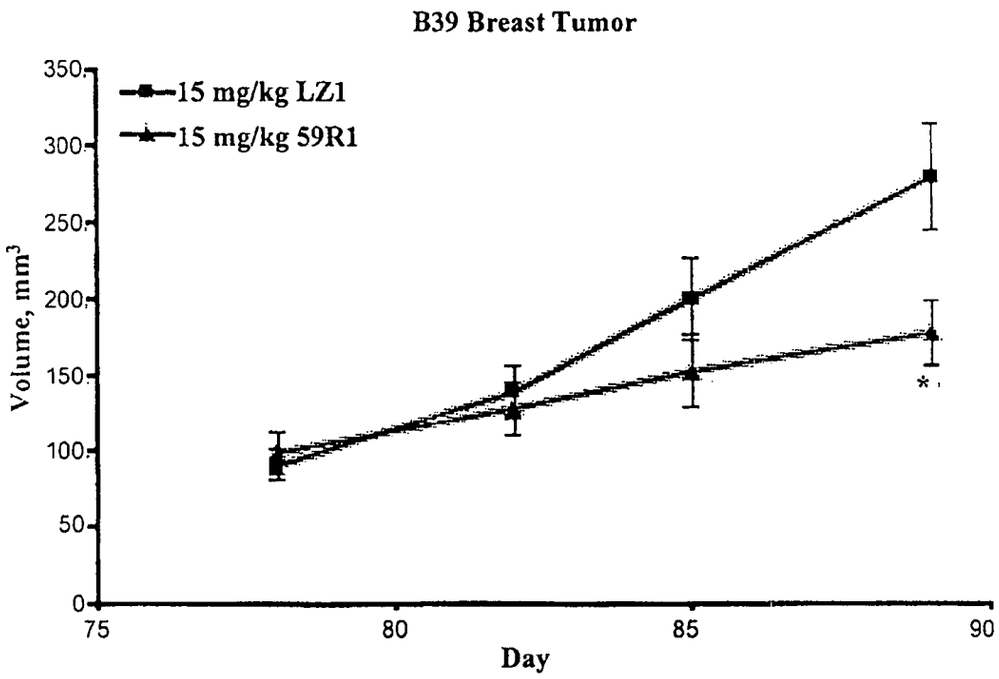

B39 Breast Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
350
300
250
200
150
100
50
0
75
80
85
90
Day
*

Figure 11F

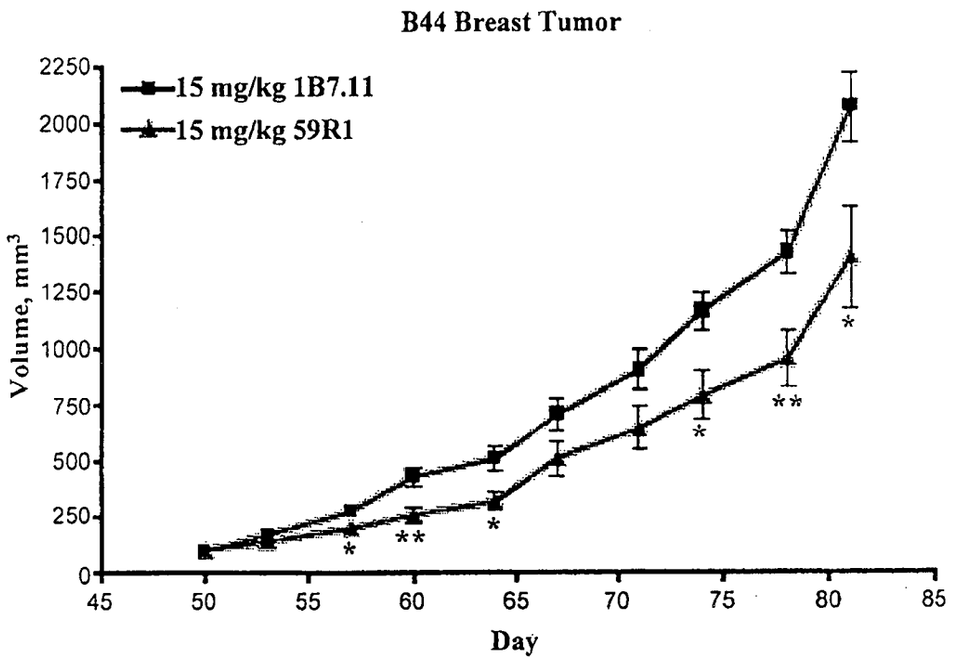

B44 Breast Tumor
15 mg/kg 1B7.11
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
Day
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
45
50
55
60
65
70
75
80
85
*
**
*
*
**
*

Figure 11G

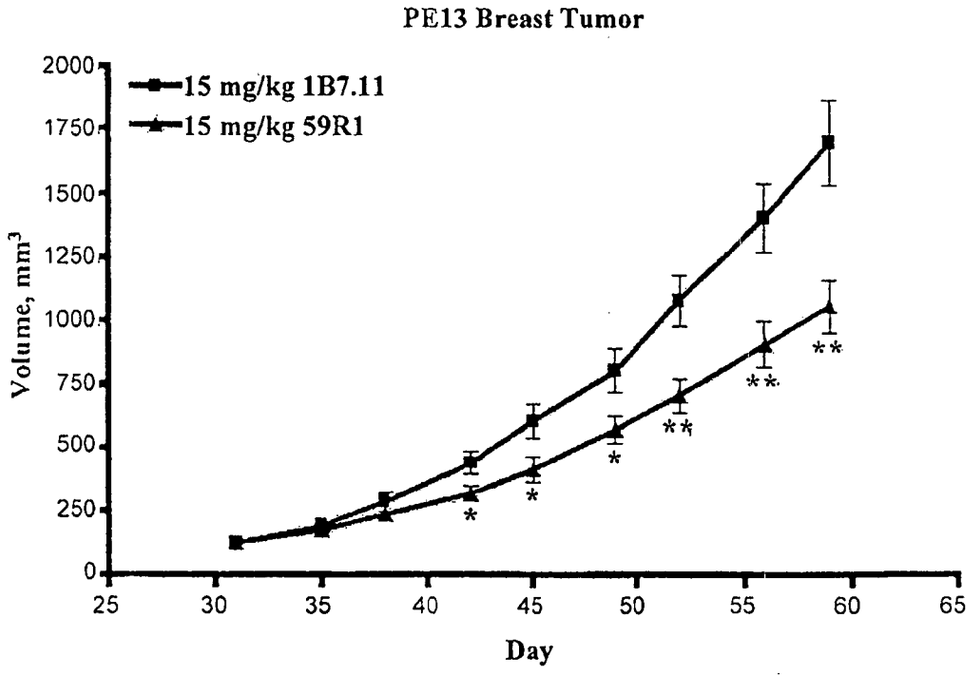

PE13 Breast Tumor
15 mg/kg 1B7.11
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
25
30
35
40
45
50
55
60
65
Day
*
*
*
**
**
**

Figure 11H

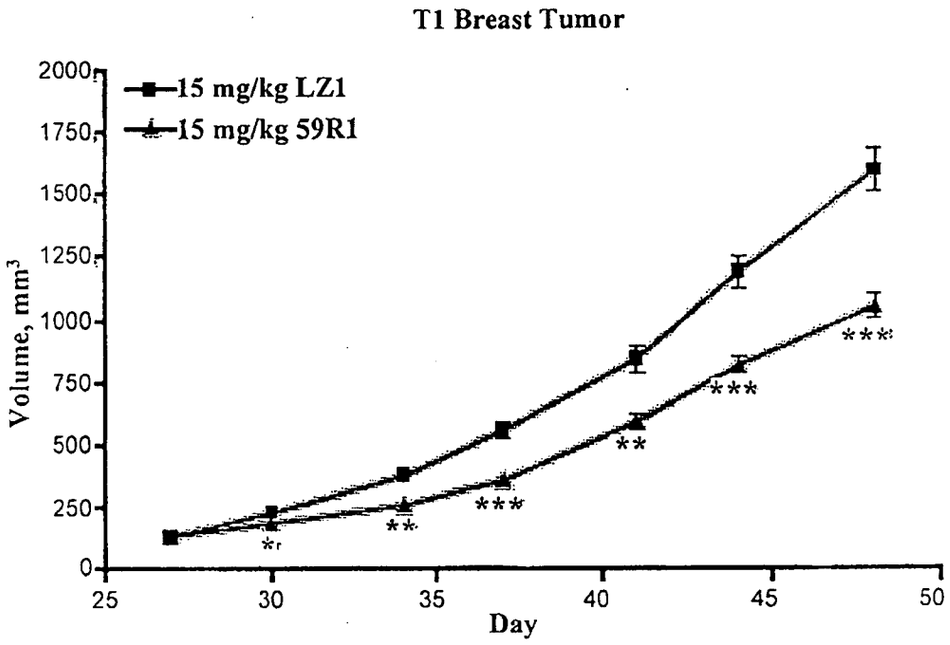

T1 Breast Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
Day
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
25
30
35
40
45
50
*r
**
***
**
***
***

Figure 12A

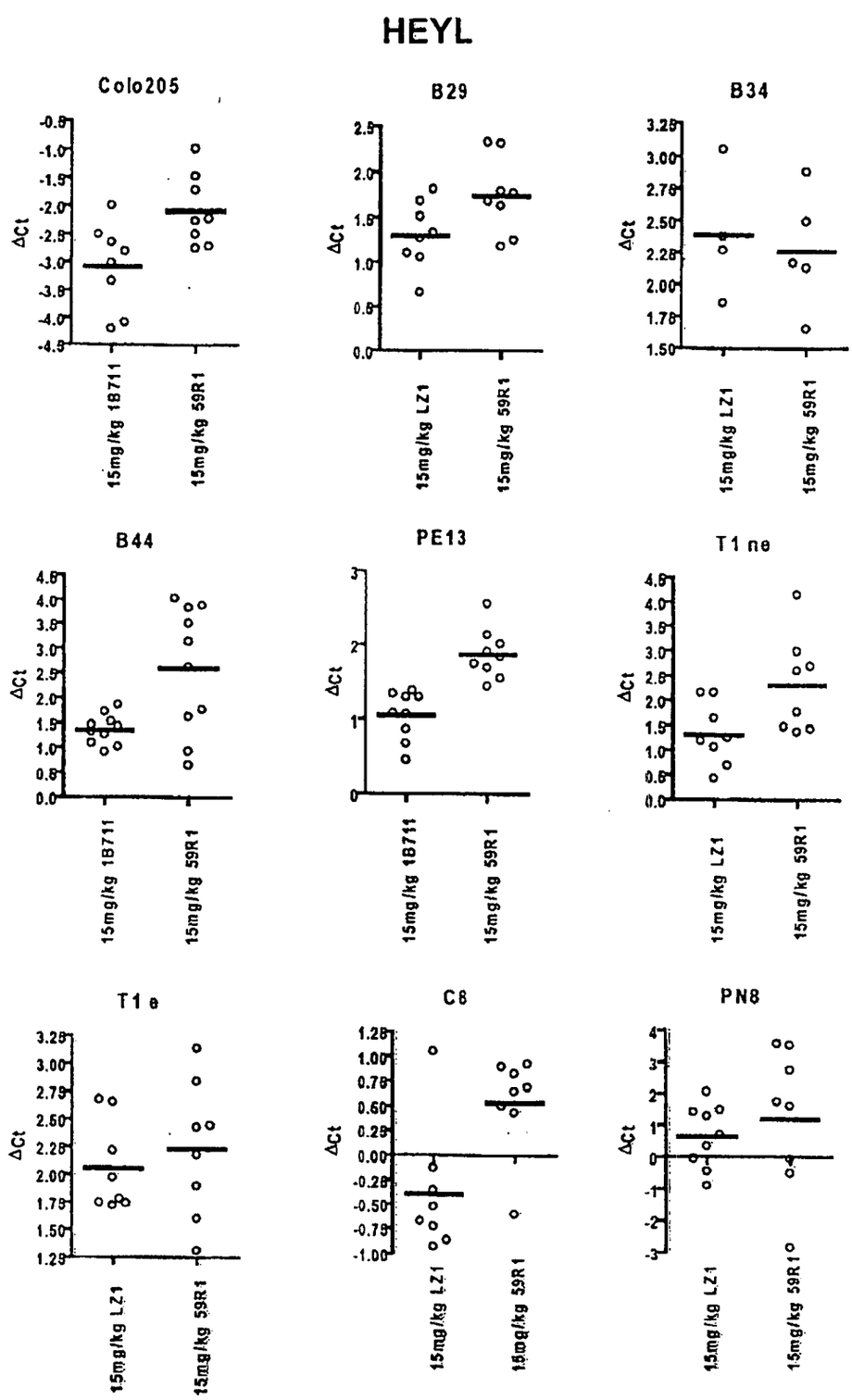

HEYL
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg 59R1
15mg/kg LZ1

Figure 12B

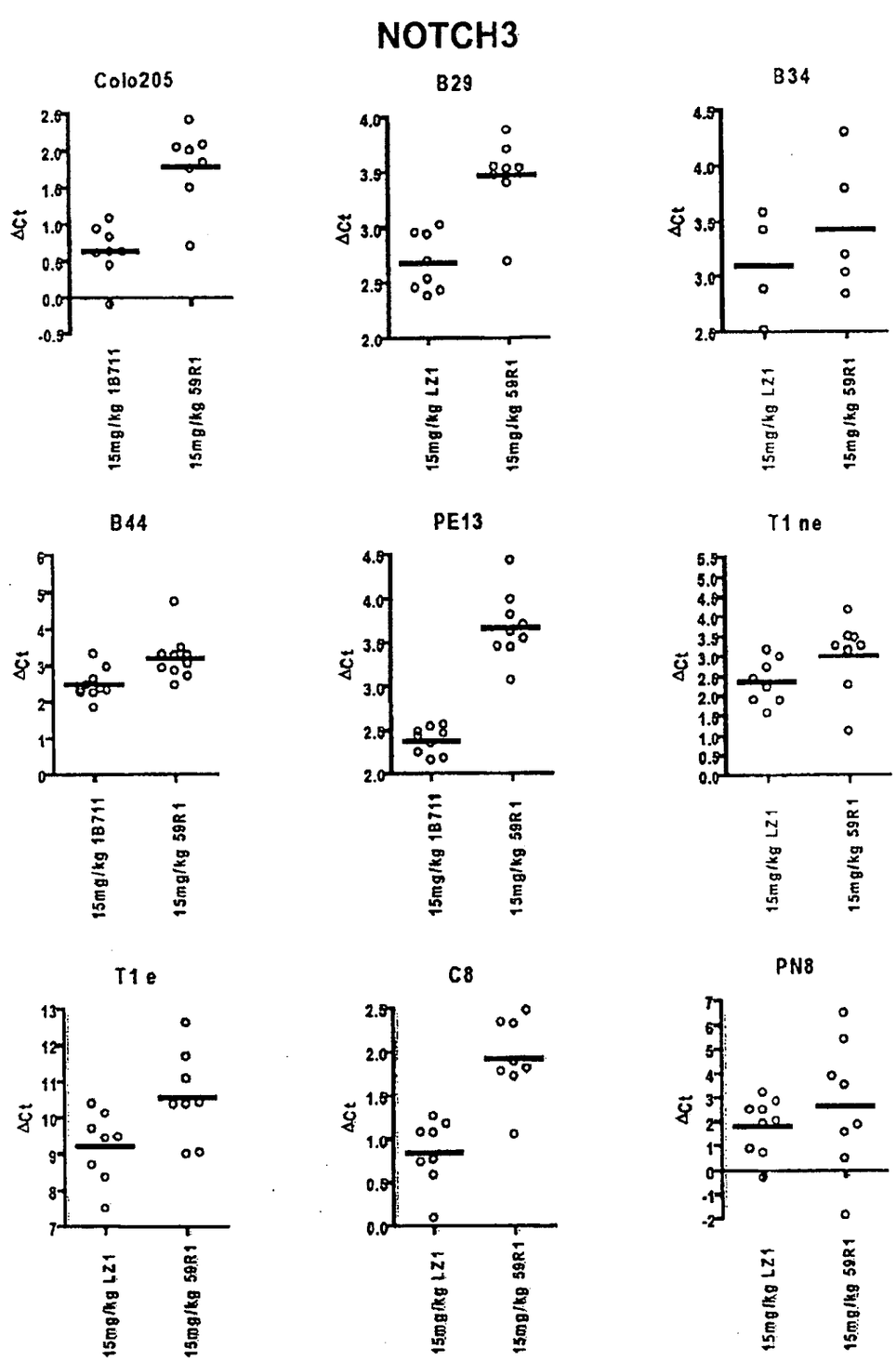

NOTCH3
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg LZ1
15mg/kg 59R1

Figure 12C

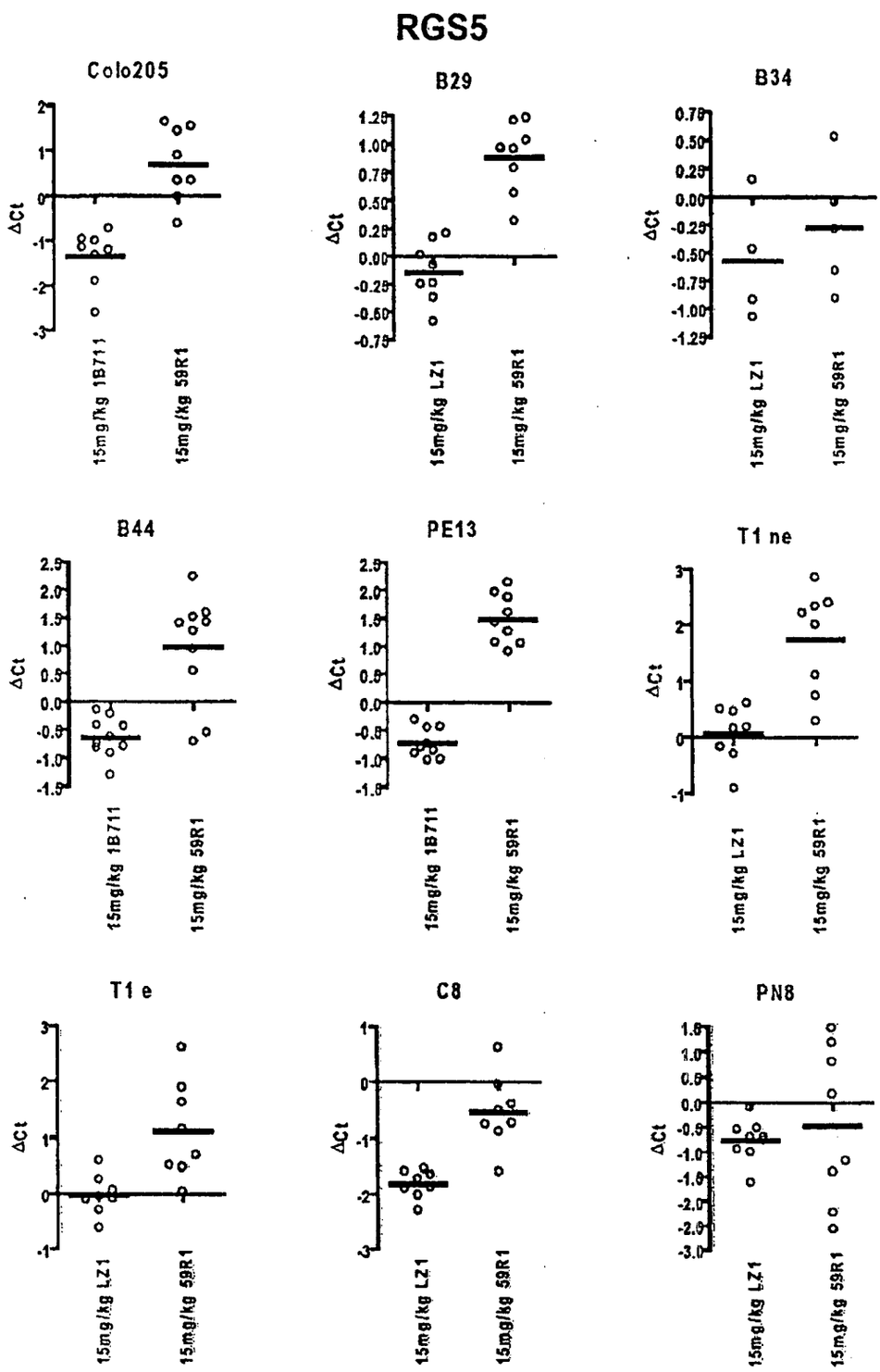

RGS5
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg LZ1
15mg/kg 59R1

Figure 12D

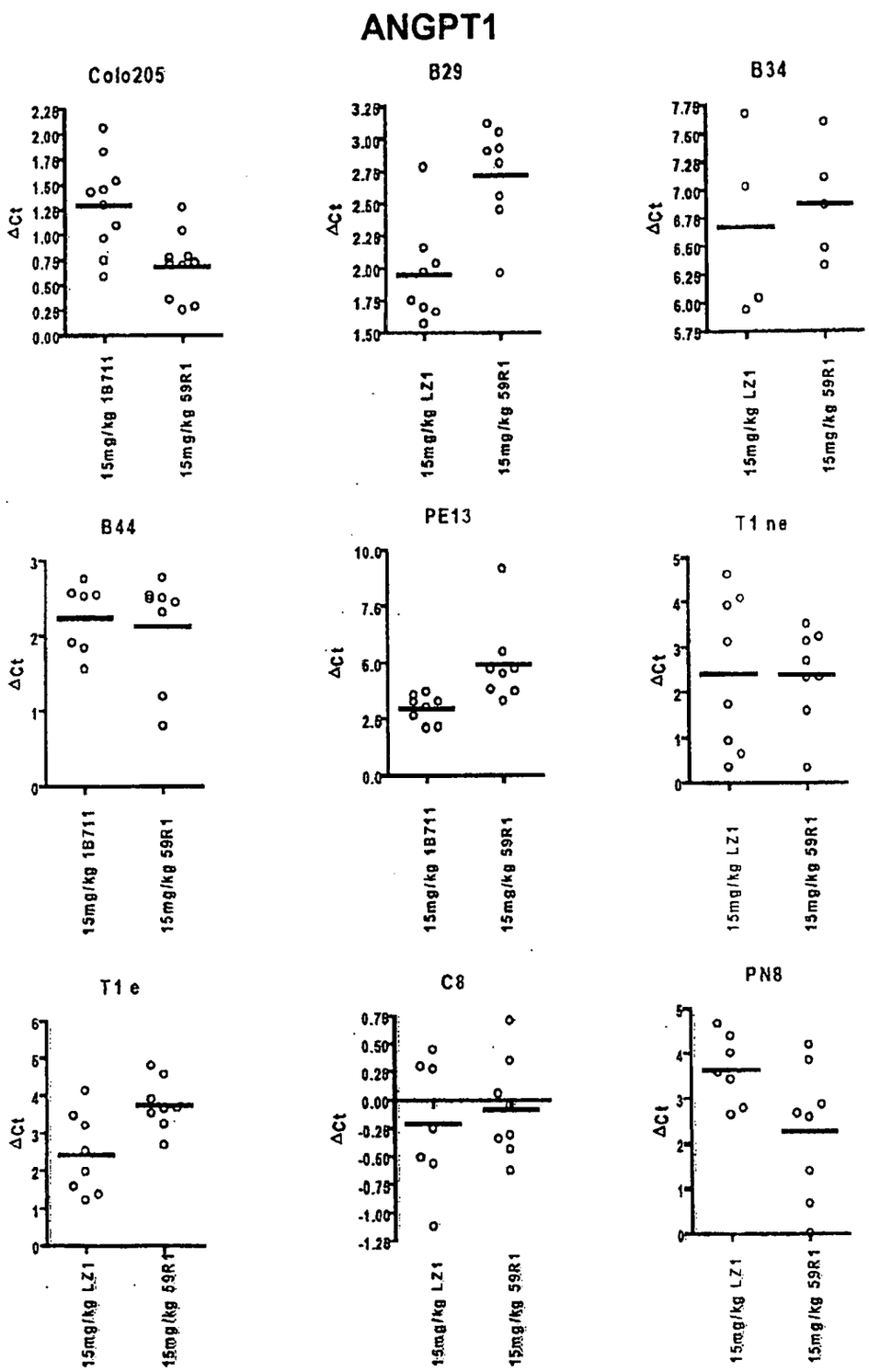

ANGPT1
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg 59R1
15mg/kg LZ1

Figure 12E

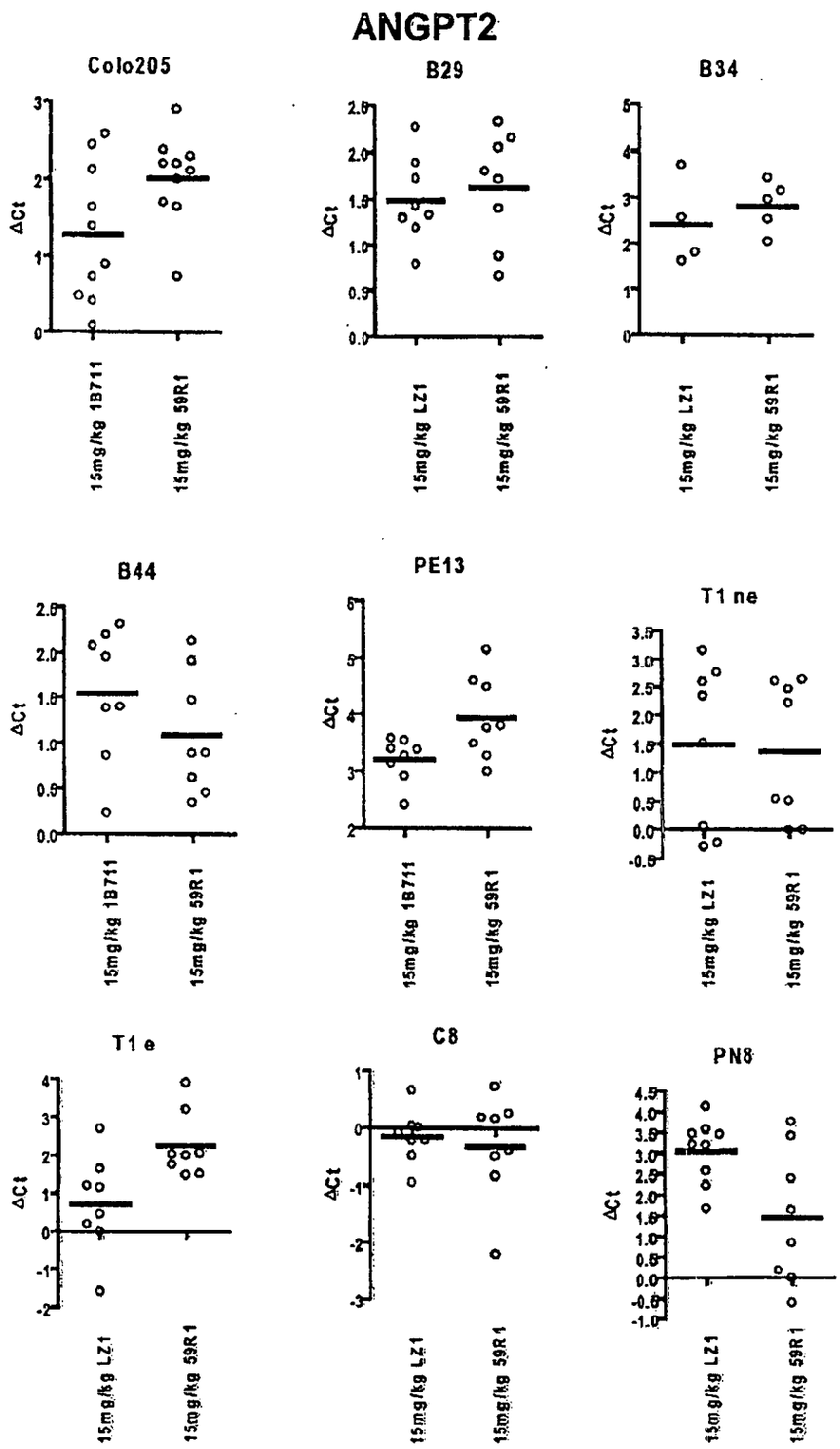

ANGPT2
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg LZ1
15mg/kg 59R1

Figure 13

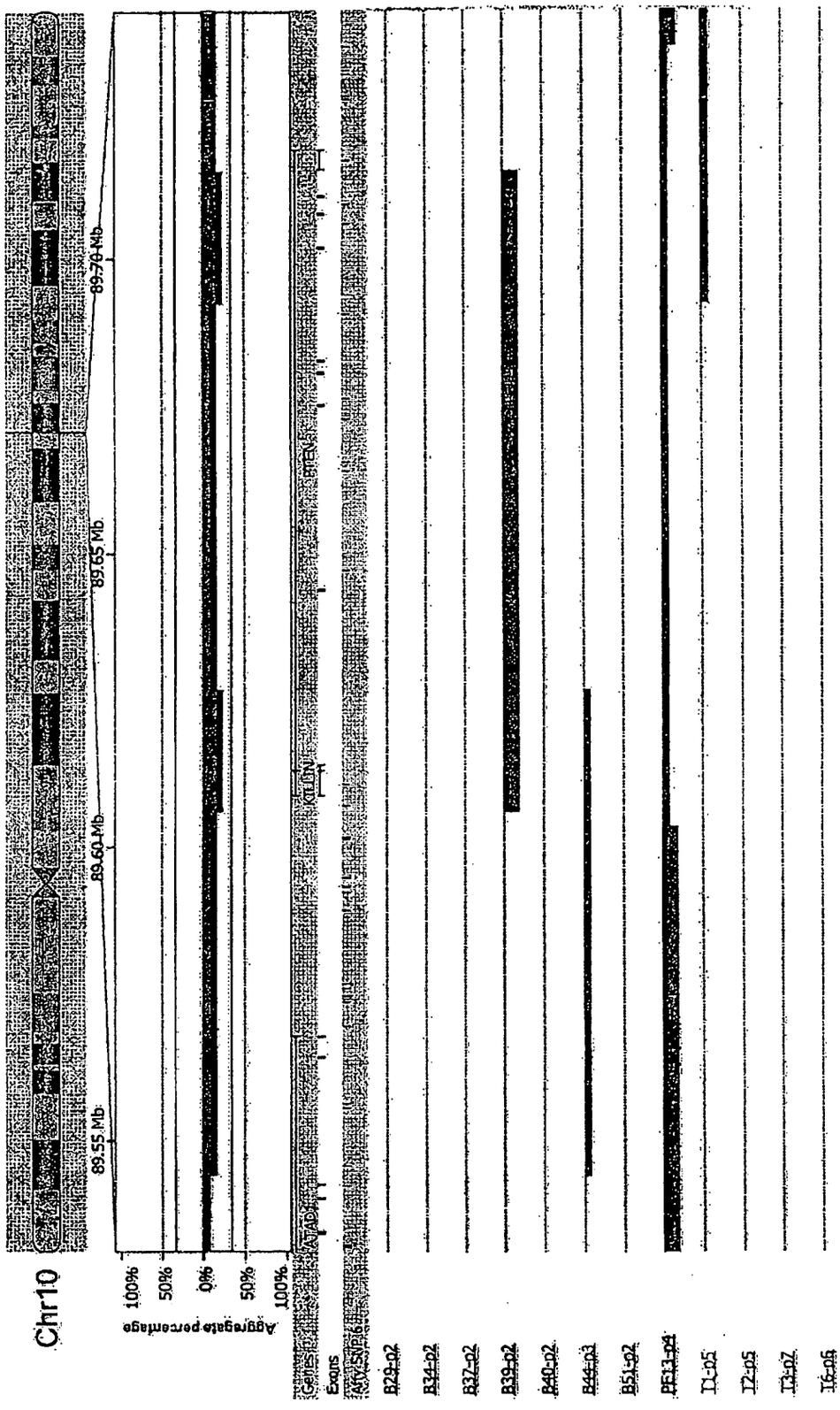

Chr10
89.55 Mb
89.60 Mb
89.65 Mb
89.70 Mb
Aggregate percentage
100%
50%
0%
50%
100%
Genes
PTEN
KCTD21
Exons
MyvSNP6
B29-p2
B34-p2
B37-p2
B39-p2
B40-p2
B44-p3
B51-p2
PE13-p4
I1-p5
I2-p5
I3-p7
I6-p6

Figure 14

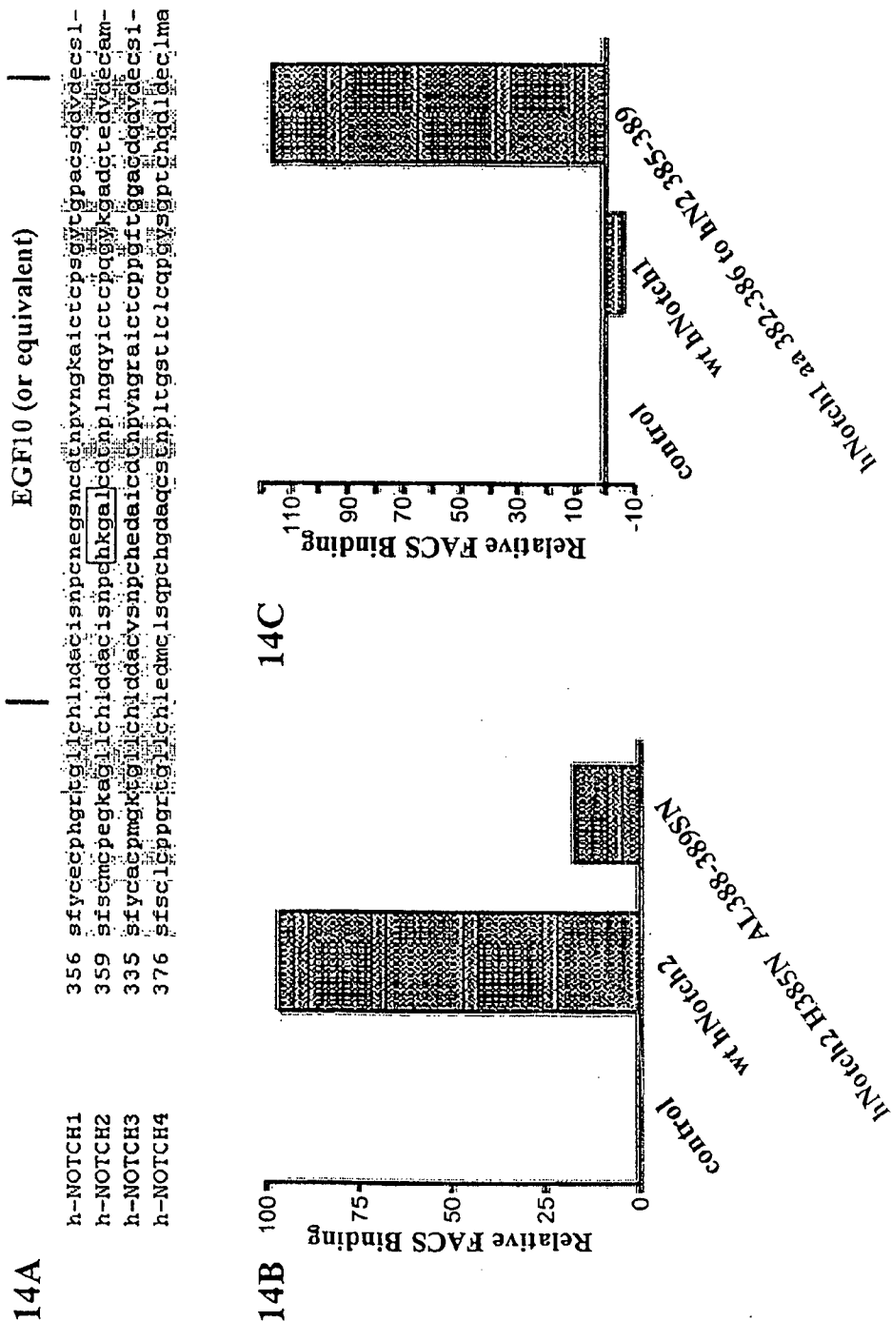

14A
EGF10 (or equivalent)
h-NOTCH1 356 sfycecphgrlgllchlndacisnpcnegsncdcnpvngkaicscpsgytgpacsqdvdecsl-
h-NOTCH2 359 sfscmcpegkagllchlddacisnpchkgalcdcnplngqyiccpqgykgadctedvdecam-
h-NOTCH3 335 sfycacpmgkcgllchlddacvsnpchedaicdcnpvngraicccppgftggacdqdvdecsl-
h-NOTCH4 376 sfsclcppgrcgllchledmclsqpchgdaqcscnpltgsticlcqpgysgptchgldecima
14B
Relative FACS Binding
100
75
50
25
0
control
wt hNotch2
hNotch2 H385N AL388-389SN
14C
Relative FACS Binding
110
90
70
50
30
10
-10
control
wt hNotch1
hNotch1 aa 382-386 to hN2 385-389

Figure 15A

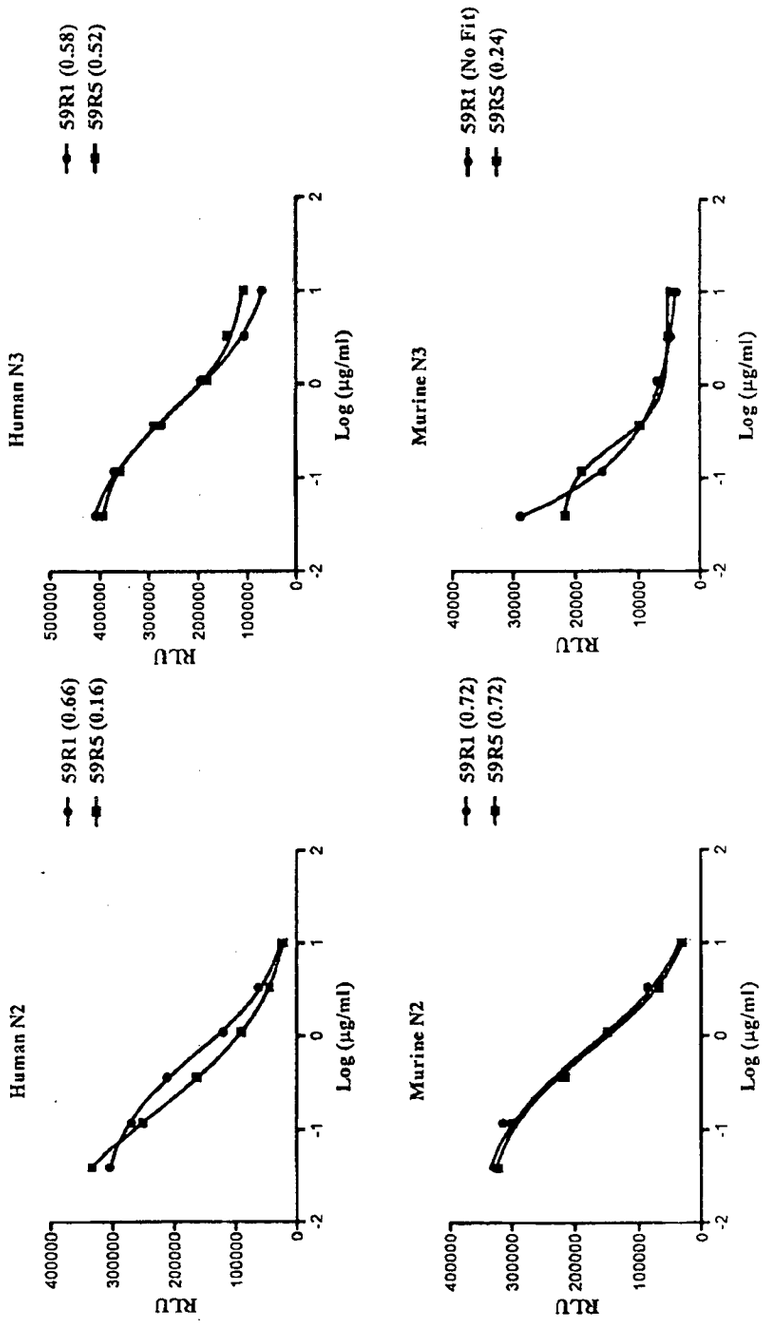

Human N3
59R1 (0.58)
59R5 (0.52)
RLU
Log (µg/ml)
Murine N3
59R1 (No Fit)
59R5 (0.24)
RLU
Log (µg/ml)
Human N2
59R1 (0.66)
59R5 (0.16)
RLU
Log (µg/ml)
Murine N2
59R1 (0.72)
59R5 (0.72)
RLU
Log (µg/ml)

Figure 15B

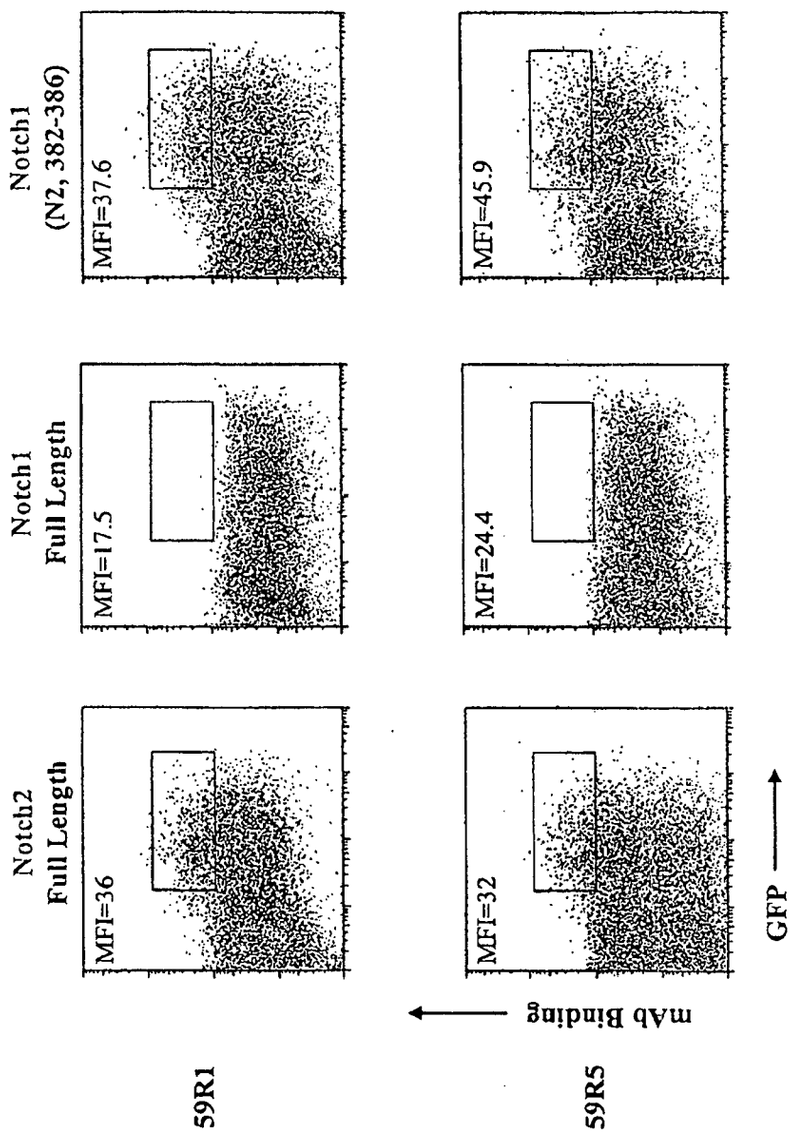
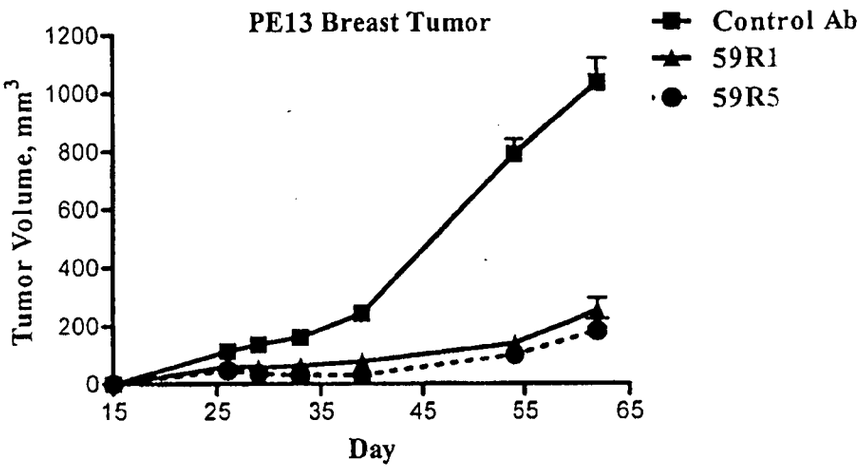

Notch2
Full Length
MFI=36
Notch1
Full Length
MFI=17.5
Notch1
(N2, 382-386)
MFI=37.6
MFI=32
MFI=24.4
MFI=45.9
59R1
59R5
mAb Binding
GFP

Figure 16

16A



16B

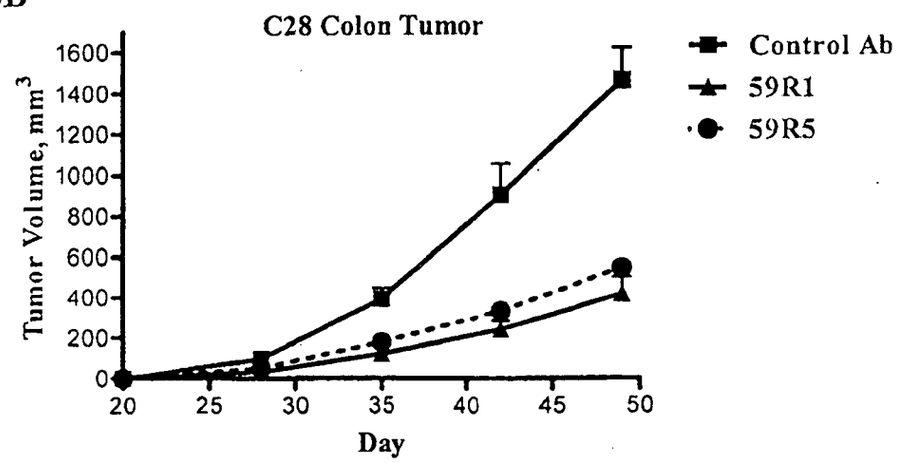


Figure 16

16C

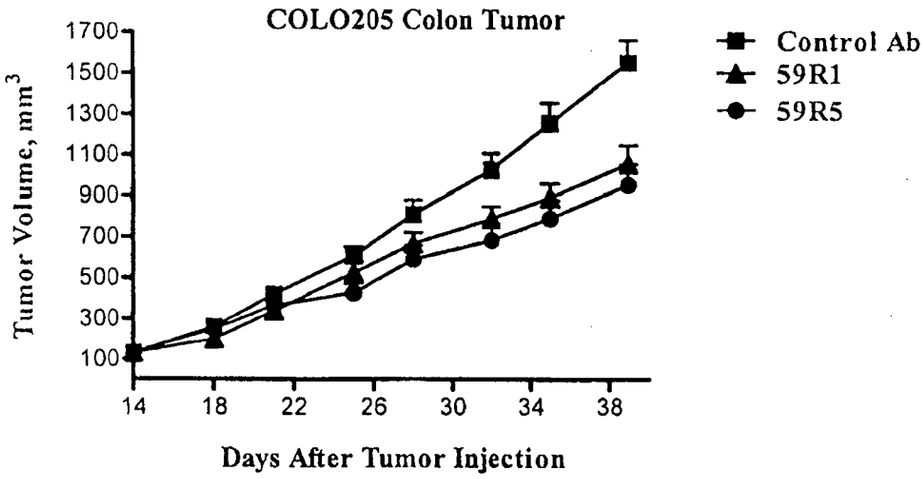
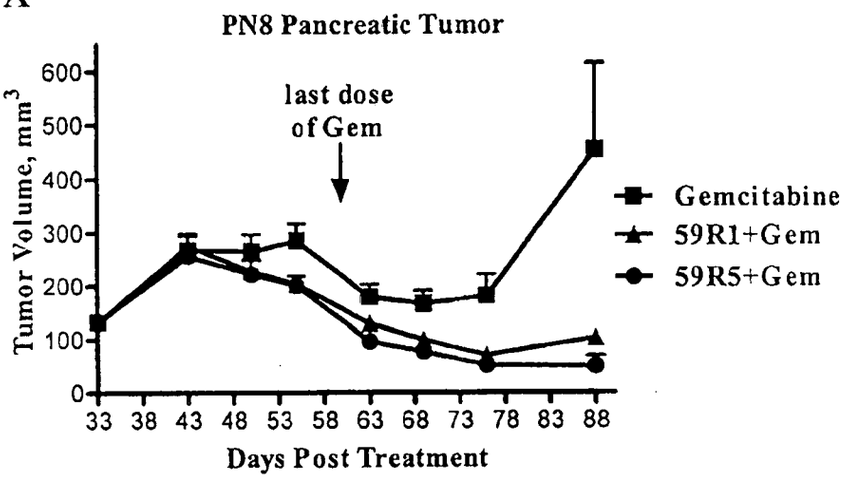


Figure 17

17A



17B

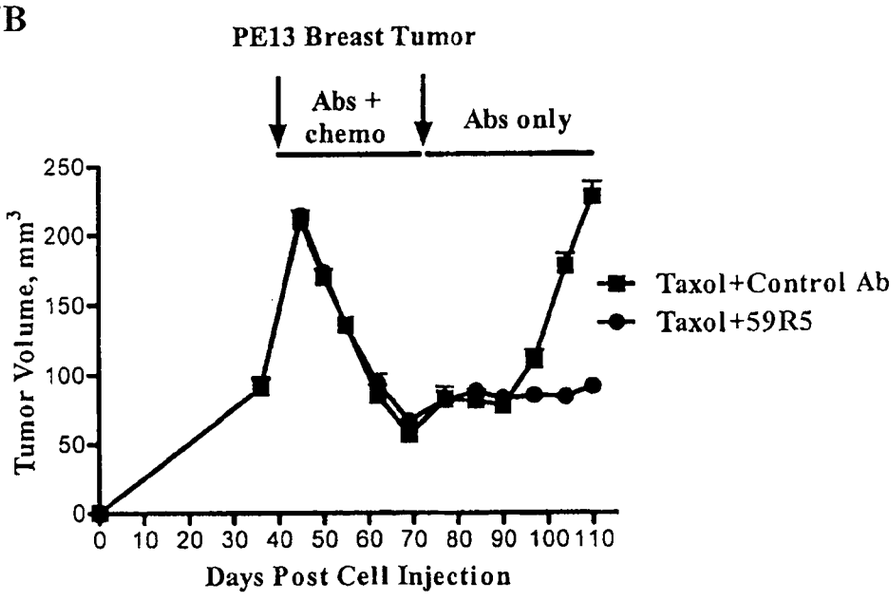
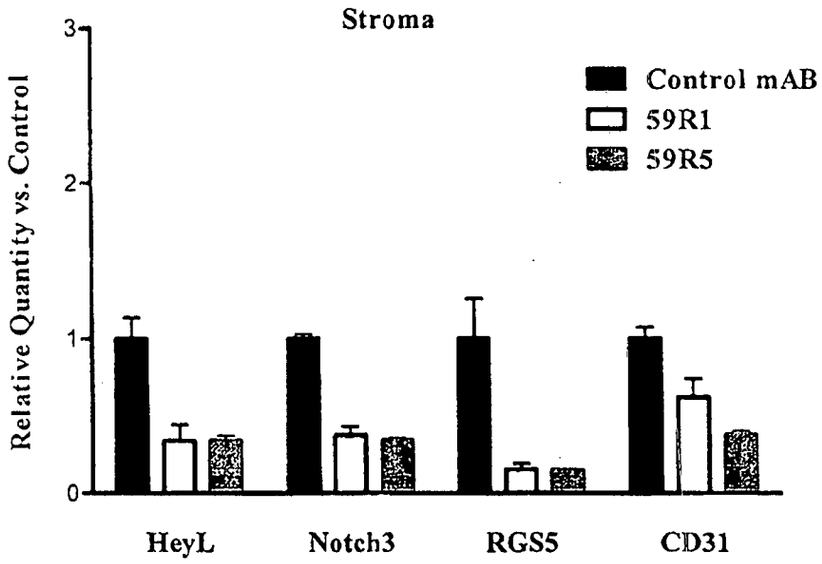
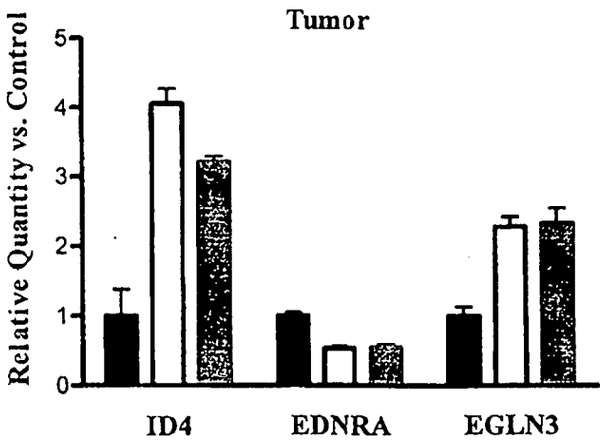


Figure 18

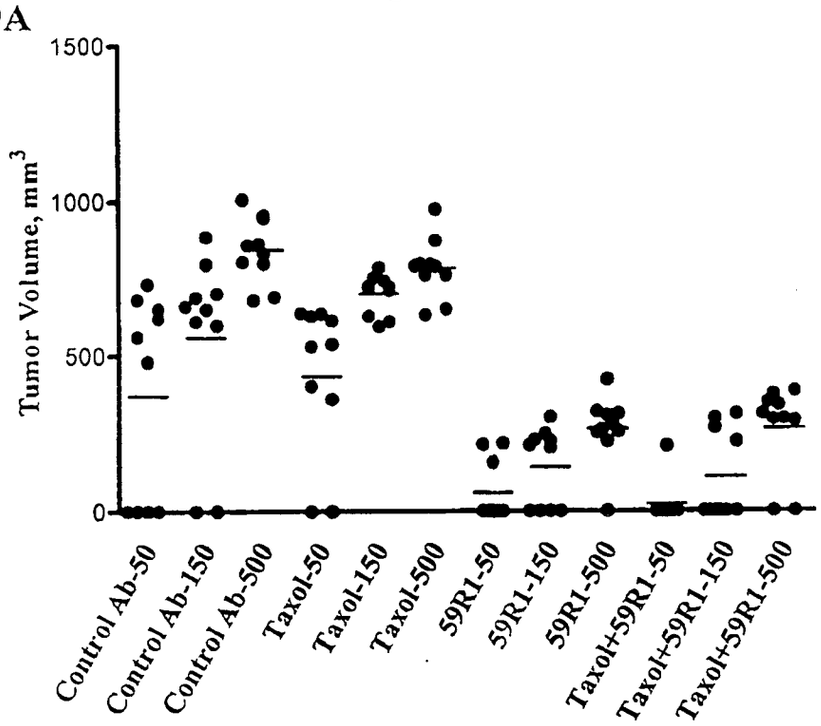

Stroma
Control mAB
59R1
59R5
Relative Quantity vs. Control
0
1
2
3
HeyL
Notch3
RGS5
CD31


Tumor
Relative Quantity vs. Control
0
1
2
3
4
5
ID4
EDNRA
EGLN3

a1

Figure 19

19A



19B

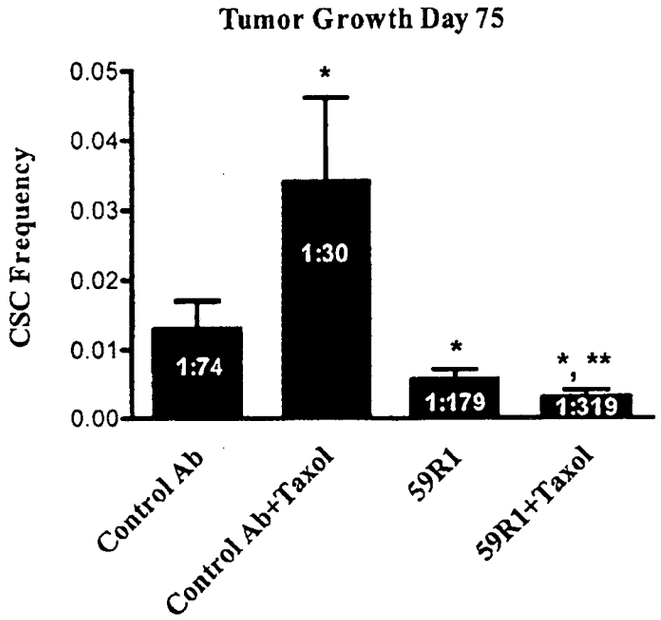
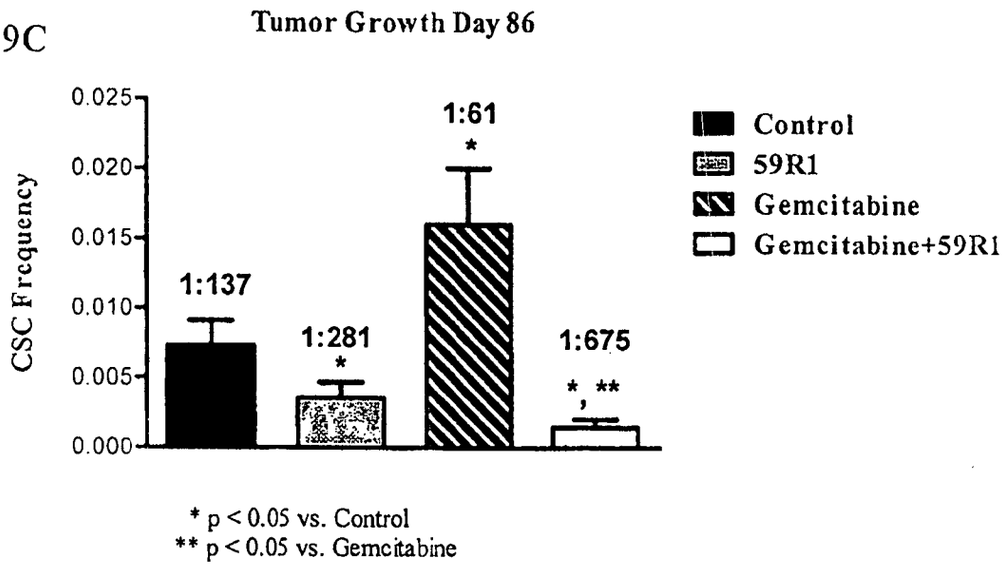


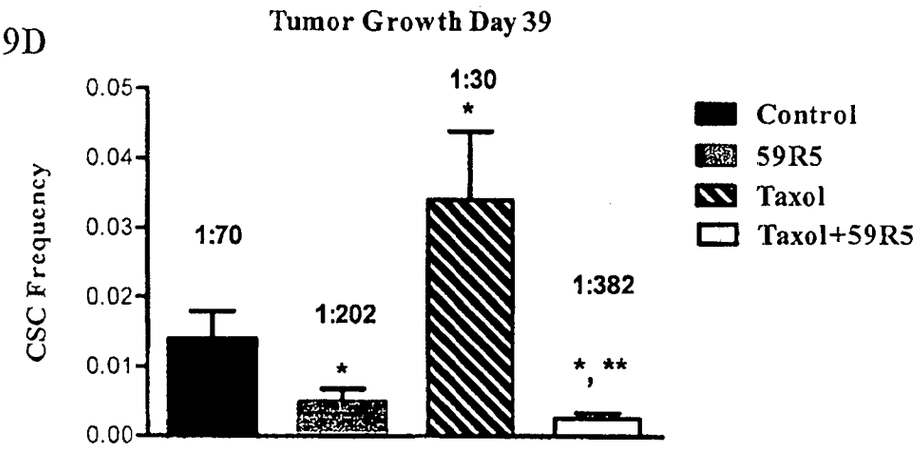
Figure 19

19C



* p < 0.05 vs. Control
** p < 0.05 vs. Gemcitabine

19D



* p < 0.05 vs. Control
** p < 0.05 vs. Taxol

AGENTES Y ANTAGONISTAS FIJADORES DE NOTCH Y MÉTODOS PARA EL USO DE LOS MISMOS

FUNDAMENTO DEL INVENTO

Campo del Invento

El presente invento se relaciona con composiciones que comprenden un agente que fija un receptor Notch humano y métodos para utilizar estas composiciones para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades. Más específicamente, el presente invento proporciona, por ejemplo, anticuerpos que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhiben el crecimiento tumoral. El presente invento además proporciona métodos de tratar cáncer, el método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de una proteína receptora Notch humana e inhibe crecimiento tumoral.

Fundamento

La ruta de señalización Notch es uno de los diferentes reguladores críticos de formación de patrones embriónicos, mantenimiento tisular post-embriónico, y biología de células madre. Más específicamente, la señalización Notch está involucrada en el proceso de inhibición lateral entre destinos de células adyacentes y juega un papel importante en determinación de destino celular durante divisiones celulares asimétricas. La señalización Notch no regulada está asociada con numerosos cánceres humanos donde se puede alterar el destino de desarrollode células tumorales para mantenerlas en un estado no diferenciado proliferativo (Brennan y Brown, 2003, *Breast Cáncer Res.* 5:69). Así la carcinogénesis puede avanzar al usurpar mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y reparación tisular por poblaciones de células madre (Beachy, 2004, *Nature* 432:324).

El receptor Notch fue primero identificado en mutantes de drosofila con haploinsuficiencia resultando en notches la margen lateral, mientras perdida de función produce un fenotipo "neurogénico" lembriónico letal donde las células de la epidermis

cambian destino a tejido neural (Moohr, 1919, *Genet.* 4:252; Poulson, 1937, *PNAS* 23:133; Poulson, 1940, *J. Exp. Zool.* 83:271). El receptor Notch es un receptor de transmembrana de paso sencillo que contiene numerosas repeticiones tipo factor de crecimiento epidérmico en tandem (EGF) y tres repeticiones Notch/LIN-12 ricas en cisteina dentro de un dominio extracelular grande (Wharton ., 1985, *Cell* 43:567; Kidd ., 1986, *Mol. Cell Biol.* 6:3094; citados en Artavanis ., 1999, *Science* 284:770). Cuatro proteínas Notch mamíferas han sido identificadas (Notch1, Notch2, Notch3, y Notch4), y las mutaciones en estos receptores invariablemente resultan en anormalidades de desarrollo y patologías humanas incluyendo varios cánceres como se describe en detalle a continuación (Gridley, 1997, *Mol. Cell Neurosci.* 9:103; Joutel & Tournier-Lasserve, 1998, *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:619-25).

Los receptores Notch son activados por ligandos de transmembrana de paso sencillo de la familia Delta, Serrated, Lag-2 (DSL). Existen cinco ligandos Notch conocidos en mamíferos: tipo Delta 1 (DLL1), tipo Delta 3 (DLL3), tipo Delta 4 (DLL4), Jagged 1 (JAG1) y Jagged 2 (JAG2) caracterizados por un domain DSL y repeticiones tipo EGF en tándem dentro del dominio extracelular. El dominio extracelular del receptor Notch interactúa con aquel de sus ligados, típicamente sobre células adyacentes, resultando en dos escisiones proteolíticas de Notch, una escisión extracelular mediada por una proteasa ADAM (Una Disintegrina Y Metalopeptidasa) y una escisión dentro del dominio de transmembrana mediada por gamma secretasa. Esta última escisión genera el dominio intracelular Notch (ICD), el cual luego entra al núcleo donde activa el CBF1, Suppressor de Hairless [Su(H)], Lag-2 (CSL) familia de factores de transcripción como los principales efectores corriente abajo para aumentar la transcripción de factores helice-bucle-helice nucleares básicos de transcripción de la familia Pilosa y Mejoradora división [E(spl)] (Artavanis ., 1999, *Science* 284:770; Brennan y Brown, 2003, *Breast Cáncer Res.* 5:69; Iso, 2003, Arterioscler. *Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). Rutas intracelulares alternativas que involucran la proteína citoplásmica Deltex identificada en Drosofila también pueden existir en mamíferos (Martinez ., 2002, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:524-33), y esta ruta dependiente de Deltex puede actuar para suprimir la expresión de genes objetivo Wnt (Brennan ., 1999, *Curr. Biol.* 9:707-710; Lawrence ., 2001, *Curr. Biol.* 11:375-85).

Los receptores Notch mamiferos experimentan escisión para formar el receptor maduro y también despues de fijación de ligandos para activar señalización corriente abajo.

Una proteasa tipo furina escinde los receptores Notch durante maduración para generarheterodimeros de juxtamembrana que comprenden una subunidad extracelular no covalentemente asociada y una subunidad de transmembrana mantenidas juntas en un estado auto inhibitorio. La fijación de ligandos alivia esta inhibición e induce escisión del receptor Notch mediante una metaloproteasa tipo ADAM y una gamma-secretasa, la última de las cuales libera el dominio intracelular (ICD) en el citoplasma, permitiéndole translocar hacia el núcleo para activar la transcripción genética. La escisión por ADAM ocurre dentro del dominio de escisión no fijador de ligandos dentro de la región reguladora negativa próxima de membrana.

Las células madre hematopoyéticas (HSCs) son las células madre mejor entendidas en el cuerpo, y la señalización Notch esta implicada en su mantenimiento normal así como también en transformación leucémica (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73). HSCs son una población rara de células que residen en un nicho estromal dentro de la médula ósea adulta. Estas células se caracterizan tanto por un único perfil de expression genética así como también una capacidad para continuamente dar origen a más células progenitoras diferenciadas para reconstituir el sistema hematopoyético entero. La activación constitutiva de señalización Notch en HSCs y células progenitoras establece líneas celulares inmortalizadas que generan células tanto linfoides como mieloides *in vitro* y en ensayos de reconstitución de largo plazo (Varnum-Finney ., 2000, *Nat. Med.* 6:1278-81), y la presencia de Jagged1 aumenta injerto de poblaciones de células de médula ósea humana enriquecidas para HSCs (Karanu ., 2000, *J. Exp. Med.* 192:1365-72). Más recientemente, la señalización Notch ha sido demostrada en HSCs *in vivo* y se ha mostrado que está involucrada en inhibición de diferenciación HSC. Además, la señalización Notch parece requerirse para auto-renovación de HSC mediada por Wnt (Duncan ., 2005, *Nat. Immunol.* 6:314).

La ruta de señalización Notch también plays un papel central en el mantenimiento de células madre neurales y está implicada en su mantenimiento normal así como también en cánceres cerebrales (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73; Purow, 2005, *Cancer Res.* 65:2353-63; Hallahan, 2004, *Cancer Res.* 64:7794-800). Las celulas madre neurales dan origen a todas las células neuronales y gliales en el sistema nervioso mamífero durante desarrollo, y más recientemente han sido identificadas en el cerebro adulto (Gage,

2000, *Science* 287:1433-8). Ratones deficientes para Notch1; los genes objetivo Notch Hes1, 3, y 5; y un regulador de señalización Notch presenilina1 (PS1) muestran números disminuidos de células madre neurales embriónicas. Además, células madre neurales adultas están reducidas en los cerebros de ratones heterozigotos PS1 (Nakamura, 2000, *J. Neurosci.* 20:283-93; Hitoshi, 2002, *Genes Dev.* 16:846-58). La reducción en células madre neurales parece resultar a partir de su diferenciación prematura en neuronas (Hatakeyama, 2004, *Dev.* 131:5539-50) indicando que la señalización Notch regula diferenciación de células madre neurales y auto-renovación.

La señalización Notch aberrante está implicada en un número de cánceres humanos. El gen Notch1 en humanos fue primero identificado en un subgrupo de leucemias linfoblásticas agudas de células T como un sitio translocado resultando en activación de la ruta Notch (Ellisen, 1991, *Cell* 66:649-61). La activación constitutiva de señalización Notch en T-células en modelos murinos genera de manera similar linfomas de células T indicando un rol causativo (Robey, 1996, *Cell* 87:483-92; Pear, 1996, *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan, 2001, *Blood* 98:3793-9; Bellavia, 2000, *EMBO J.* 19:3337-48). Mutaciones puntuales Notch 1, inserciones, y supresiones que producen señalización Notch aberrante también se han encontrado frecuentemente presentes en linfoma/leucemia linfoblástica aguda de células T tanto infantiles como adultas (Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33).

La inserción frecuente del virus tumoral mamario murino en ambos el sitio Notch1 y Notch4 en tumores mamarios y los fragmentos proteicos Notch activados resultantes primero implicaron señalización Notch en cáncer de mama (Gallahan & Callahan, 1987, *J. Virol.* 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, *Breast Cáncer Res.* 5:69; Politi, 2004, *Semin. Cáncer Biol.* 14:341-7). Además estudios en ratones transgénicos han confirmado un rol para Notch en ramificación ductal durante desarrollo de glándulas mamarias normales, y una forma constitutivamente activa de Notch4 en células epiteliales mamarias inhibe la diferenciación epitelial y resulta en en tumorigénesis (Jhappan, 1992, *Genes & Dev.* 6:345-5; Gallahan, 1996, *Cáncer Res.* 56:1775-85; Smith, 1995, *Cell Growth Differ.* 6:563-77; Soriano, 2000, *Int. J. Cáncer* 86:652-9; Uyttendaele, 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi, 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). La evidencia de un rol para Notch en cáncer humano de mama es proporcionada por datos que muestran la expresión de receptores Notch en

carcinomas de mama y su correlación con el resultado clínico (Weijzen, 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr, 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86). Además, la sobrexpresión de la ruta Notch se ha observado en cánceres cervicales (Zagouras, 1995, *PNAS* 92:6414-8), carcinomas de células renales (Rae, 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32), carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Leethanakul, 2000, *Oncogene* 19:3220-4), cánceres endometriales (Suzuki, 2000, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9), y neuroblastomas (van Limpt, 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8), sugestivos de un rol principal para Notch en el desarrollo de un número de neoplasmas. De manera interesante, la señalización Notch puede jugar un rol en el mantenimiento de la condición no diferenciada de células neoplásicas Apc-mutantes del colon (van Es & Clevers, 2005, *Trends en Mol. Med.* 11:496-502).

La ruta Notch también está involucrada en múltiples aspectos de desarrollo vascular incluyendo proliferación, migración, diferenciación de musculo liso, angiogénesis y diferenciación arterial-venosa (Iso, 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). Por ejemplo, las mutaciones homócigas nulas en Notch1/4 y Jagged1 así como también perdida heterócigа de DLL4 resultan en defectos serveros aunque variables en desarrollo arterial y vascularización de saco vitelino. Además, los embriones de ratones DLL1-deficientes y Notch2-hipomórficos muestran hemorragia que probablemente resulta del pobre desarrollo de estructuras vasculares (Gale, 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs, 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue, 1999, *Hum. Mel. Genet.* 8:723-30; Hrabe de Angelis, 1997, *Nature* 386:717-21; McCright, 2001, *Dev.* 128:491-502). En humanos, las mutaciones en Jagged1 están asociadas con síndrome de Alagille, un trastorno de desarrollo que incluye defectos vasculares, y las mutaciones en Notch3 son responsables de demencia vascular heredada (Cadasil) en la cual la homeostasis de vasos es defectuosa (Joutel, 1996, *Nature* 383:707-10).

Anticuerpos anti-Notch y su posible uso como terapéuticos anti-cáncer han sido previamente reportados. Ver, ej., Publicación de Solicitud de Patente estadounidense No. 2008/0131434, la cual se incorpora en la presente como referencia en en su totalidad. Ver también Publicación Internacional No. WO 2008/057144 y WO 2008/076960, así como también Publicaciones de Solicitudes de Patentes estadounidenses Nos. 2008/0226621, 2008/0118520, y 2008/0131908.

BREVE RESUMEN DEL INVENTO

El presente invento proporciona agentes fijadores Notch novedosos y antagonistas novedosos de uno o más receptores Notch humanos, así como también métodos para utilizar estos agentes y antagonistas. El presente invento además proporciona polipéptidos novedosos, tales como anticuerpos que fijan uno o más receptores Notch humanos, fragmentos de tales anticuerpos, y otros polipéptidos relacionados con tales anticuerpos. En ciertas realizaciones, el invento proporciona antagonistas de Notch2 humano y/or Notch3 humano, incluyendo, pero sin limitar a, anticuerpos que específicamente fijan Notch2 humano y/or Notch3 humano. Como se utiliza en la presente, la frase "Notch2 y/o Notch3" means "Notch2," "Notch3," o "ambos Notch2 y Notch3." En ciertas realizaciones, los anticuerpos u otros antagonistas se fijan a una región del receptor Notch que está fuera del dominio fijador de ligandos (ej., EGF10 de Notch2 o EGF9 de Notch3). En ciertas realizaciones, los anticuerpos específicamente fijan Notch2 humano. En ciertas realizaciones, los anticuerpos específicamente fijan ambos Notch2 humano y Notch3 humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos específicamente fijan Notch3 humano. Polinucleotidos que comprenden secuencias de ácidos nucléicos que codifican los polipéptidos también se proporcionan, como vectores que comprenden los polinucleotidos. También se proporcionan células que comprenden los polipéptidos y/o polinucleotidos del invento. Composiciones (ej., composiciones farmacéuticas) que comprenden los antagonistas Notch novedosos, también se proporcionan. Métodos para utilizar los agentes y antagonistas también se proporcionan, tales como métodos para utilizar los antagonistas Notch para inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de tumores, inhibir angiogénesis, y/o tratar cáncer u otras enfermedades asociadas con angiogenesis.

En un aspecto, el invento proporciona un agente (ej., un anticuerpo) que específicamente se fija a un dominio EGF10 (o un equivalente de un dominio EGF10) de uno o más receptores Notch humanos. En ciertas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente es un antagonista. En ciertas realizaciones, el agente específicamente se fija a EGF10 de Notch2 humano y/o EGF9 de Notch3 humano. EGF9 es el EGF dentro de Notch3 humano que es equivalente a EGF10 en los otros receptores Notch humanos Notch1, Notch2, y Notch4. En algunas realizaciones, el agente específicamente se fija a EGF10 de Notch 2. En algunas realizaciones, el agente

específicamente se fija a EGF10 de Notch 2 y a EGF9 de Notch 3. En algunas realizaciones, el agente específicamente se fija a EGF9 de Notch 3. En otras embodiments, el agente se fija a al menos parte de la secuencia HKGAL (SEQ ID NO:28) dentro de Notch2 EGF10. En algunas realizaciones, el agente se fija a al menos parte de la secuencia HEDAI (SEQ ID NO:29) dentro de Notch3 EGF9.

En ciertas realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados o realizaciones, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en otra parte en la presente, el agente inhibe fijación de un ligando a Notch2 humano y/o Notch3. En algunas realizaciones, el agente inhibe fijación de un ligando a Notch2 humano. En algunas realizaciones, el agente inhibe fijación de un ligando a Notch2 y Notch3. En otras realizaciones, el agente inhibe fijación de un ligando a Notch3. En ciertas realizaciones, the ligando es DLL4, JAG1 o JAG2. En otras realizaciones, el agente inhibe señalización de Notch2 humano y/o Notch3. En algunas realizaciones, el agente inhibe señalización de Notch2 humano. En algunas realizaciones, el agente inhibe señalización de Notch2 y Notch3. En otras realizaciones, el agente inhibe señalización de Notch3. En algunas realizaciones la señalización Notch2 y/o Notch3 es inducida por DLL4, JAG1 o JAG2. Composiciones farmacéuticas que comprenden el agente y métodos para utilizar el agente para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer también se proporcionan.

En un aspecto adicional, el invento proporciona un anticuerpo que específicamente fija Notch2 humano y/o Notch3, en donde el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:51); y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), o una variante de la mismaque comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o una

CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:51), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras. Composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para utilizar el anticuerpo para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de a tumor, y/o tratar cáncer también se proporcionan.

En un aspecto adicional, el invento proporciona un anticuerpo que específicamente fija Notch2 humano y/o Notch3, en donde el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GIFFAI (SEQ ID NO:7); y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente fija Notch2. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GIFFAI (SEQ ID NO:7), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), o una variante de la misma que

comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras. Composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para utilizar el anticuerpo para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer también se proporcionan.

En another aspect, el invento proporciona un anticuerpo que específicamente fija Notch2 humano y/o Notch3, en donde el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende (G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30); y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYPT (SEQ ID NO:22). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SSSFFAS (SEQ ID NO:23). En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SSFYAS (SEQ ID NO:24). En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SSFFAT (SEQ ID NO:25). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYPS (SEQ ID NO:26). En aún otras realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SSFFAN (SEQ ID NO:27). Composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para utilizar el anticuerpo para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer también se proporcionan.

En otro aspecto, el invento proporciona un polipéptido que comprende: (a) un polipéptido (ej., una región variable de cadena pesada) que tiene al menos identidad de secuencia de 80% aproximadamente con SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, o SEQ ID NO:20 (con o sin secuencia señal); y/o (b) un polipéptido (ej., una región variable de cadena liviana) que tiene al menos identidad de secuencia del 80% aproximadamente con SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:39 (con o sin secuencia señal). En ciertas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas

realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch2 humano y/o Notch3. En algunas realizaciones, el polipéptido específicamente se fija a Notch2 humano. En algunas realizaciones, el polipéptido se fija a Notch2 y Notch3. En otras realizaciones, el polipéptido se fija a Notch3. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o aproximadamente 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:13, o SEQ ID NO:50. Composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido y métodos para utilizar el polipéptido para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cancer, también se proporcionan.

En aún otro aspecto, el invento proporciona un polipéptido (ej., un anticuerpo o un cadena pesada o cadena liviana de un anticuerpo) que comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos identidad de secuencia del 80% aproximadamente con SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:16, o SEQ ID NO:2 (con o sin secuencia señal); y/o (b) un polipéptido que tiene al menos identidad de secuencia del 80% aproximadamente con SEQ ID NO:18, o SEQ ID NO:4 (con o sin secuencia señal. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o aproximadamente 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:40. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos de tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos.

En otro aspecto, el invento proporciona un polipéptido (ej., un anticuerpo o una cadena pesada o cadena liviana de un anticuerpo) que comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos identidad de secuencia del 80% aproximadamente con SEQ ID NO:50; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos identidad de secuencia del 80% aproximadamente con SEQ ID NO:13. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o aproximadamente 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:50 o SEQ ID NO:13. En ciertas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo que fija Notch2 humano y/o Notch3 humano. Composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos de tratar cáncer que comprenden

administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos, también se proporcionan.

En otro aspecto, el invento proporciona un anticuerpo que comprende, consiste, o consiste esencialmente de un anticuerpo 59R1 IgG2 que comprende la cadena pesada y cadena liviana de SEQ ID NOs:16 y 18 (con o sin secuencia señal), respectivamente, o como se codificó por el DNA depositado con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, bajo las condiciones del Tratado de Budapest de October 15, 2008, y número de designación asignado PTA-9547. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para utilizar el anticuerpo para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cancer.

En un aspecto adicional, el invento proporciona un anticuerpo que comprende, consiste o consiste esencialmente de un anticuerpo 59R5 IgG2 que comprende la cadena pesada y cadena liviana de SEQ ID NO:49 y SEQ ID NO:18 (con o sin secuencia señal), respectivamente, o como se codificó por el DNA depositado con el ATCC en Julio 6, 2009, y número de designación asignado PTA-10170. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprende el anticuerpo y métodos para utilizar el anticuerpo para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer también se proporcionan.

En otro aspecto, el invento proporciona un anticuerpo que compite por fijación específica a Notch2 humano y/o Notch3 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:14 y una región variable de cadena liviana que comprende SEQ ID NO:13. En ciertas realizaciones, el anticuerpo compite por fijación específica con un anticuerpo 59R1 IgG2 que comprende la cadena pesada y cadena liviana de SEQ ID NOs:16 y 18 (con o sin secuencia señal), respectivamente, o como se codificó por el ADN depositado con el ATCC en Octubre 15, 2008, y número de designación asignado PTA-9547. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite por fijación a Notch2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite por fijación a Notch2 humano y Notch3. En otras realizaciones, el anticuerpo compite por fijación a Notch3 humano. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprende el

anticuerpo y métodos para utilizar el anticuerpo para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer.

En un aspecto adicional, el anticuerpo compite por fijación específica a Notch2 humano y/o Notch3 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:50 y una región variable de cadena liviana que comprende SEQ ID NO:13. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite por fijación específica con un 59R5 anticuerpo que comprende la cadena pesada y cadena liviana de SEQ ID NOs: 49 y 18, respectivamente, o como se codificó por el ADN depositado con el ATCC en Julio 6, 2009, y número de designación asignado PTA-10170. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite por fijación a Notch2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite por fijación a Notch2 humano y Notch3. En otras realizaciones, el anticuerpo compite por fijación a Notch3 humano. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para utilizar el anticuerpo para usos tales como inhibir angiogenesis, inhibir crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer.

En ciertos otros aspectos, el invento proporciona un polipéptido (con o sin a secuencia señal) que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, y SEQ ID NO:57, así como también un polinucleotido que codifica tal polipéptido. En ciertas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a Notch2 humano y/o Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a Notch2 humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a Notch2 humano y Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a Notch3 humano. En otro aspecto, el invento proporciona un polinucleotido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO:60.

En otro aspecto, el invento proporciona un método para la modulación la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular en un sujeto (ej., en el sitio de un tumor u otra

angiogénesis aberrante en el sujeto). En ciertas realizaciones, el método comprende administrar un cantidad efectiva de un agente que específicamente fija Notch2 humano y/o Notch3 humano al sujeto. En ciertas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo descrito en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en la presente. En ciertas realizaciones, el agente es un antagonista. En ciertas realizaciones, el agente específicamente se fija a y es un antagonista de Notch3 humano. En ciertas realizaciones, la modulación de la función de los pericitos y/o células de musculo liso vascular resulta en inhibición de angiogenesis y/o crecimiento tumoral.

En aún otro aspecto, el invento proporciona un método de inhibir angiogenesis (ej., angiogénesis tumoral) en un sujeto. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente que específicamente fija Notch2 humano y/o Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el agente es un antagonista. En algunas realizaciones, el agente específicamente se fija a Notch2 humano y es un antagonista del mismo. En ciertas realizaciones, el agente específicamente se fija a Notch3 humano y es un antagonista del mismo. En algunas realizaciones, el agente es un antagonista tanto de Notch2 como de Notch3. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo descrito en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en la presente. En algunas realizaciones, el antagonista no es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el método de inhibir angiogenesis además comprende administrar al sujeto un antagonista de factor de creciento de células endoteliales vasculares (VEGF) o de un receptor VEGF. En ciertas realizaciones, el método es un método de inhibir angiogenesis al modular la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular.

En un aspecto adicional, el invento proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Notch2 humano y/o Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que específicamente fija Notch2 humano. En algunas realizaciones, el antagonista es un

anticuerpo que específicamente fija ambos Notch2 humano y Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que específicamente fija Notch3 humano. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo descrito en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en la presente. En ciertas realizaciones, el tumor comprende una supresión u otra mutación en el gen homólogo de fosfatasa y tesina (PTEN). En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor de mama.

En un aspecto aún adicional, el invento proporciona un método de seleccionar un sujeto para tratamiento con un antagonista Notch2 humano y/o Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el método comprende (a) determinar si el tumor comprende una supresión o mutación en el gen homologo de fosfatasa y tesina (PTEN); y (b) seleccionar el sujeto para tratamiento con un antagonista Notch2 y/o Notch3 si el tumor comprende la supresión o mutación. En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con un antagonista Notch2. En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con un antagonista Notch2 y Notch3. En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con un antagonista Notch3. En algunas realizaciones el antagonista es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor de mama.

En otro aspecto, el invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de al menos un receptor Notch humano (ej., 1, 2, 3, o 4 receptores Notch). En ciertas realizaciones, la región no fijadora de ligandos comprende o consta de la repetición EGF10 de un receptor Notch humano (o un equivalente de EGF10, tal como EGF9 de Notch3 humano). En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe fijación de un ligando a un receptor Notch. En ciertas realizaciones, el anticuerpo inhibe señalización por el receptor Notch. En algunas realizaciones, el receptor Notch es un receptor Notch1, Notch2, Notch3, o Notch4 humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a Notch2 (por ejemplo, EGF10 de Notch2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a Notch2 y al menos a un receptor Notch adicional. En ciertas realizaciones, el Notch adicional es un receptor Notch3. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos de tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos.

En un aspecto adicional, el invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a dos o mas (es decir, al menos dos, tres, o cuatro) receptores Notch humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de los dos o mas receptores Notch humanos. En ciertas realizaciones, si los dos o más receptores Notch humanos comprenden Notch1, Notch2, o Notch4, el anticuerpo se fija a EGF10 de Notch1, Notch2, o Notch4, y si los dos o mas receptores Notch humanos comprenden Notch3, el anticuerpo se fija a EGF9 de Notch3. En ciertas realizaciones, la región no fijadora de ligandos no es EGF4. En ciertas realizaciones, los dos o mas receptores Notch humanos comprenden Notch2. En ciertas realizaciones, los dos o más receptores Notch humanos comprenden Notch3. En aún una realizacíon adicional, los dos o más receptores Notch humanos comprenden Notch2 y Notch3. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un antagonista de los dos o mas receptores Notch humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo inhibe crecimiento tumoral. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprende los anticuerpos y métodos de tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos.

En aún otro aspecto, el invento proporciona un anticuerpo aislado que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch2 humano e inhibe crecimiento tumoral, en donde la región no fijadora de ligandos comprende o consta de la repetición EGF10 del receptor Notch2 humano (ej., SEQ ID NO:36). En algunas realizaciones, el anticuerpo no se fija a ninguna región de Notch2 humano fuera de repetición EGF10. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente también se fija a la repetición EGF10 (o equivalente) de al menos un receptor Notch humano adicional (ej., EGF9 de Notch3). En algunas realizaciones, el anticuerpo se fija a Notch2 humano EGF10 y Notch3 EGF9. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos de tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos.

En aún otro aspecto, el invento proporciona un anticuerpo aislado que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch3 humano e inhibe crecimiento tumoral, en donde la región no fijadora de ligandos comprende o consta de la repetición EGF 9 del receptor Notch3 humano

(equivalente a EGF10 en los otros receptores Notch). En algunas realizaciones, el anticuerpo no fija a ninguna región de Notch3 humano fuera de repetición EGF 9. En ciertas realizaciones, el anticuerpo también específicamente se fija a repetición EGF 10 de al menos un receptor Notch humano adicional. En algunas realizaciones, el anticuerpo se fija a Notch3 humano EGF9 y Notch2 EGF10. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprende los anticuerpos y métodos de tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos.

En un aspecto aún adicional, el invento proporciona un anticuerpo que se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano y comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GIFFAI (SEQ ID NO:7); y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). En ciertas realizaciones, el receptor Notch humano es Notch2. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se fija a EGF10 de un receptor Notch2 humano y/o EGF9 de un receptor Notch3 humano. En un aspecto adicional, el invento proporciona un anticuerpo that compite con tal anticuerpo por fijación específica a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de Notch2 en un ensayo de fijación competitivo. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos de tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos. También se proporcionan métodos de inhibir angiogenesis que comprenden administrar las composiciones.

En otro aspecto, el invento proporciona un anticuerpo que se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano y comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:51); y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). En ciertas realizaciones, el receptor Notch

humano es Notch2. En algunas realizaciones, el anticuerpo se fija a los receptores Notch2 y Notch3 humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se fija a EGF10 de un receptor Notch2 humano y/o EGF9 de un receptor Notch3 humano. En otra realización, el invento proporciona un anticuerpo que compite con tal anticuerpo por fijación específica a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de Notch2 en un ensayo de fijación competitivo. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos de tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos. También se proporcionan métodos de inhibir angiogenesis que comprenden administrar las composiciones.

En ciertas realizaciones de cada uno de los aspectos o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en otra parte en la presente, el anticuerpo específicamente se fija a ambos Notch2 humano y Notch3 humano.

En ciertas realizaciones de cada uno de los aspectos o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en otra parte en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimerico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es monovalente, bivalente o multivalente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecifico. En ciertas realizaciones, un sitio individual fijador de antigenos del anticuerpo se fija (o es capaz de fijar) a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de mas de un receptor Notch humano (ej., Notch2 y Notch3). En ciertos realizaciones alternativas, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es conjugado a una fracción citotoxica. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es aislado. En aún una realizacíon adicional, el anticuerpo es substancialmente puro.

En ciertas realizaciones de cada uno de los aspectos o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en otra parte en la presente, el cáncer o tumor tratado con el anticuerpo es un cáncer o tumor de mama,

colorectal, pulmonar, pancreatico, de prostata, o de cabeza y cuello. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor es melanoma. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de mama. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor colorectal. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor pancreatico. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de prostata.

En ciertas realizaciones de cada uno de los aspectos o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en otra parte en la presente, los métodos de tratar cáncer comprenden inhibir crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, los métodos de tratar cáncer comprenden reducir la tumorigenicidad de tumores (ej., al reducir la frecuencia de células madre cáncerigenas en el tumor).

En ciertas realizaciones de cada uno de los aspectos o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en otra parte en la presente, el antagonista o anticuerpo se administra a un sujeto en combinación con un tratamiento adicional para cáncer. En ciertas realizaciones, el tratamiento adicional para cáncer comprende terapia de radiación, quimioterapia, y/o un anticuerpo adicional terapéutico. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional para cáncer comprende un agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, la quimioterapia comprende paclitaxel (ej., TAXOL), irinotecan, gemcitabina, y/o oxaliplatino. En ciertas realizaciones, el anticuerpo terapéutico adicional es un anticuerpo que específicamente se fija un receptor Notch humano (ej., Notch1, 2, 3, o 4) o un receptor Notch humano ligando (ej., DLL4 o JAG1). En algunas realizaciones, el anticuerpo adicional terapéutico es un anticuerpo anti-DLL4. En ciertas realizaciones alternativas, el anticuerpo terapéutico adicional es un anticuerpo que específicamente fija un factor de creciento de células endoteliales vasculares (VEGF). En ciertas realizaciones, el terapéutico adicional fija un receptor VEGF .

En ciertas realizaciones de cada uno de los aspectos o realizaciones antes mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en otra parte en la presente, el anticuerpo se administra a un sujeto en combinación con un segundo agente terapéutico que es un agente anti-angiogénico.

Lineas célulares (ej., lineas célulares de hibridoma) que comprenden o que producen los anticuerpos u otros polipéptidos descritos en la presente son además proporcionadas por el invento. También se proporcionan polinucleotidos (ej., vectores) que

comprenden los polinucleotidos descritos en la presente, incluyendo polinucleotidos que codifican los polipéptidos o regiones de la cadena liviana variable o regiones de cadena pesada variable de los anticuerpos descritos en la presente, como son lineas célulares que comprende tales polinucleotidos.

En ciertas realizaciones, el presente invento proporciona un método de tratar cáncer, en donde el cáncer comprende células madre cáncerigenas, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo el cual fija un receptor Notch. En un aspecto más particular, el presente invento proporciona un método de tratar cáncer, en donde el cáncer comprende células madre que expresan uno o más miembros de la familia de receptores Notch, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que fija estos de la miembros de la familia de receptores Notch. El presente invento proporciona anticuerpos que se fijan al dominio no fijador de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano y son terapeuticamente efectivos contra el cáncer. Así, en ciertas realizaciones, el presente invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano y que inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el presente invento además proporciona un método de tratar cáncer, el método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un proteína receptora Notch humana e inhibe crecimiento tumoral.

Se contemplan en la presente varias ventajas de utilizar un anticuerpo que fija miembros de la familia de receptores Notch o los ligandos a esos receptores Notch para tratar cánceres. En algunas realizaciones, ciertos receptores Notch se expresan altamente en ciertos tumores sólidos, por ejemplo, de mama y colon, y esto proporciona una depresion para el farmaco activo donde el fármaco se fija al receptor Notch. Se anticipa que anticuerpos que fijan receptores Notch sobre-expresados tienen un mejor perfil de suguridad que los fármacos quimioterapéuticos actualmente disponibles.

El invento además proporciona un método de tratar cáncer en un humano, en donde el cáncer que comprende células madre cáncerigenas no se caracteriza por la sobrexpresión por la célula madre cáncerigena de uno o más receptores Notch, que comprende administrar

al humano una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo el cual se fija a un receptor Notch y bloquea la activación de ligandos de un receptor Notch.

El invento además proporciona un método de tratar cáncer en un humano que comprende administrar a l humano cantidades terapéuticamente efectivas de (a) un primer anticuerpo el cual fija un receptor Notch e inhibe crecimiento o proliferación de células madre cáncerigenas las cuales sobrexpresan receptores Notch; y (b) un segundo anticuerpo el cual fija un receptor Notch y bloquea la activación de ligandos de un receptor Notch.

El invento también proporciona un método de tratar cáncer, en donde el cáncer es seleccionado de un grupo que consta de cáncer de mama, colon, rectal y colorectal, tal método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo el cual fija Notch. El invento también proporciona otro método de tratar cáncer, en donde el cáncer es seleccionado de un grupo que consta de cáncer de mama, colon, pancreatico, de prostata, pulmonar, rectal y colorectal, tal método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que bloquea la activación de ligandos de un receptor Notch. El invento también proporciona aún otro método de tratar cáncer, en donde el cáncer es seleccionado de un grupo que consta de de cácer de mama, colon, pancreatico, de prostata, pulmonar, rectal y colorectal, tal comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que fija Notch y un anticuerpo que bloquea la activación de ligandos de un receptor Notch.

En una realización adicional, el invento proporciona articulos de fabricación para utilizar (entre otras cosas) en los métodos anteriores. Por ejemplo, el invento proporciona un articulo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo que fija Notch, y además comprende un inserto de paquete que indica que la composición puede utilizarse para tratar un cáncer que comprende células madre cáncerigenas. En algunas realizaciones, el invento proporciona un articulo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo que fija Notch, y además comprende un inserto de paquete que indica que la composición puede utilizarse para tratar cáncer que comprende células madre cáncerigenas que expresan uno o más receptores Notch.

En ciertas realizaciones, el invento adicionalmente se refiere a un articulo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo el cual fija un receptor Notch y bloquea la activación de ligandos de un receptor Notch, y además comprende un inserto de paquete que indica que la composición puede utilizarse para tratar cáncer, en donde el cáncer comprende células madre cáncerigenas que no son caracterizadas por sobrexpresión del receptor Notch.

En ciertas realizaciones, un articulo de fabricación es proporcionado el cual comprende (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un primer anticuerpo que fija un receptor Notch e inhibe crecimiento de células cáncerigenas que comprenden células madre cáncerigenas que sobrexpresan Notch; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un segundo anticuerpo el cual fija Notch y bloquea la activación de ligandos de un receptor Notch.

En algunas realizaciones, además un articulo de fabricación es proporcionado el cual comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo el cual fija Notch y bloquea la activación de ligandos de un receptor Notch, y además comprende un inserto de paquete que indica que la composición puede utilizarse para tratar un cáncer seleccionado de un grupo consistente de cáncer de colon, pancreatico, de prostata, pulmonar, rectal y colorectal.

El invento adicionalmente proporciona: un anticuerpo (ej., un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado) el cual fija Notch y bloquea la activación de ligandos de un receptor Notch; una composición que comprende el anticuerpo y un vehiculo farmaceuticamente aceptable; y un immunoconjugado que comprende el anticuerpo conjugado con un agente citotoxico.

En un aspecto, el invento proporciona un polinucleotido aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de los aspectos o realizaciones anteriormente mencionados, así como también otros aspectos y/o realizaciones descritos en otra parte en la presente. En algunas realizaciones, el invento proporciona a vector que comprende el polinucleotido. En algunas realizaciones, una célula hospedera comprende el polinucleotido o el vector. En otras realizaciones, un proceso de producir el anticuerpo

comprende cultivar una célula hospedera que comprende el polinucleotido para que el polinucleotido sea expresado y, opcionalmente, además comprende recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula hospedera (ej., apartir del medio de cultivo de la célula hospedera).

Ademas, el invento proporciona un polinucleotido aislado que codifica un anticuerpo humanizado o humano como se describe en las realizaciones o aspectos anteriormente mencionados, así como también se describe en otra parte en la presente; un vector que comprende el polinucleotido; una célula hospedera que comprende el polinucleotido o el vector; así como también un proceso de producción del anticuerpo que comprende cultivar una célula hospedera que comprende el polinucleotido para que el polinucleotido sea expresado y, opcionalmente, además que comprende recuperar el anticuerpo desde el medio de cultivo de la célula hospedera (ej., apartir del medio de cultivo de la célula hospedera).

El invento además se refiere a un immunoconjugado que comprende un anticuerpo que fija Notch conjugado a una o más moleculas de caliquiamicina, y el uso de tales conjugados para tratar un Notch que expresa cáncer, ej., un cáncer en el cual células madre cáncerigenas sobreexpresan Notch.

Donde se describen aspectos o realizaciones del invento en terminos de un grupo Markush u otra agrupación de alternativas, incluyendo, pero sin limitar a, grupos de alternativas separados por "y/o" o "o," el presente invento no solamente incluye el grupo entero listado como un todo, si no cada miembro individualmente del grupo y todos los subgrupos posibles del grupo principal, si no también el grupo principal retira uno o más de los miembros del grupo. El presente invento también contempla la exclusión explicita de uno o más de cualquiera de los miembros de grupo en el invento reivindicado. Por ejemplo, lenguaje tal como "X y/o Y" comprende "X" individualmente, "Y" individualmente, así como también "X" y "Y" juntos.

BREVE DESCRIPCION DE LAS ILUSTRACIONES /FIGURAS

Figura 1: Los anticuerpos y variantes 59R1 fijan Notch2 humano y bloquean la fijación de ligandos. (A) Análisis FACS de fijación por 59R1 Fab a Notch2 humano. "Clón 1" es 59R1 Fab el cual fue mostrado para fijar Notch2 humano sobre células

HEK293 establemente transfectadas. "Clón 5" es la Fab de un clon diferente aislado a partir de la libreria de fagos el cual no fijó Notch2. (B) análisis FACS de bloqueo de fijación de ligandos (JAG1) por 59R1 Fab. "Clón 1" es 59R1 Fab el cual fue mostrado bloqueando la fijación de una fusión hJagged1 ECD-Fc a Notch2 humano sobre células HEK293 establemente transfectadas. "Clón 5" es la Fab de un clon diferente aislado a partir de la libreria de fagos el cual no bloqueó la fijación de ligandos en el ensayo. (C) Análisis FACS de fijación de anticuerpo 59R1 IgG2 a Notch2 humano sobre células HEK293 establemente transfectadas. El anticuerpo 59R1 IgG2 se mostró fijó Notch2 humano sobre células HEK293 establemente transfectadas. (D) Análisis FACS de bloqueo de fijación de ligandos (DLL4) mediante el anticuerpo 59R1 IgG2 . El anticuerpo 59R1 IgG2 fue mostrodo por bloquear fijación de una fusión hDLL4 ECD-Fc a Notch2 humano sobre células HEK293 establemente transfectadas. (E) Estrategia de maduración de afinidad para cadena pesada CDR3 de 59R1. La secuencia precursora de la cadena pesada CDR3 de 59R1 es mostrada encerrada. Cambios de residuos permitidos son como lo indica a continuación la secuencia precursora en la Figura. (F) Tamizaje de secuencias 59R1 maduras de afinidad para capacidad de bloqueo JAG1. Las variantes mejoradas son indicadas con fechas.

Figura 2: Análisis FACS de reactividad cruzada del anticuerpo 59R1 IgG2 a los cuatro homólogos Notch humanos. Se encontró que 59R1 fija hNotch2 y hNotch3 sobre células HEK-293 temporalmente transfectadas pero se encontró que no exhibió fijación significativa a hNotch1 y hNotch4 sobre las mismas células.

Figura 3: Mapeo de epitopos del anticuerpo 59R1. (A) el anticuerpo 59R1anti-Notch2/3 se fija a repetición EGF 10 de Notch2 humano. Sobrenadante a partir de células HEK293 que expresan proteínas de fusion recombinante Notch2-Fc con las repeticiones EGF indicadas de Notch2 entre 1 y 12 (eje-x) se utilizaron en ELISA con anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3. El OD (eje-y) indicó fijación de anticuerpos (barras sombreadas) solamente a proteínas de fusión Notch 2 que comprenden la repetición EGF 10. (La Figura muestra datos obtenidos de dos experimentos separados los cuales se muestran de manera separada en las graficas superior e inferior.) (B) Las repeticiones EGF 11 y 12 están involucradas en fijación de anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 a hNotch2 de longitud completa. Análisis FACS de células HEK293 transfectadas con proteína fluorescente verde (GFP) (eje-x) sola

(izquierda superior) o co-transfectadas con GFP y bien sea Notch2 de longitud completa intacto o con Notch 2 de longitud completa con repetición EGF 11 suprimida (ΔEGF11) o repetición EGF 12 suprimida (ΔEGF12). La fijación de 59R1 es indicada a lo largo del eje-y (PE) para todas las tres proteínas Notch2 en células que expresan GFP. (C) La repetición EGF 10 está involucrada en fijación de anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 a hNotch2 de longitud completa, pero no en la fijación de ligandos. La fijación por un anticuerpo 59M70 anti-Notch2 que se fija a EGF1-4 de hNotch2 se indica como "fijación anti-Notch2." La fijación por DLL4 se indica como "fijación de ligandos."

Figura 4: El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 inhibe señalización Notch2 en ensayos de reporteros de luciferasa. (A) 59R1 bloquea actividad del reportero Notch2 inducida por hDLL4. (B) 59R1 bloquea actividad del reportero Notch2 inducida por hJAG1 (C) 59R1 bloquea actividad del reportero Notch2 inducida por hJAG2.

Figura 5: El anticuerpo 59R1 de receptor Notch2/3 inhibe formación y crecimiento tumoral *in vivo*. (A) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe la formación de tumores de mama PE13. Ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales de mama PE13 fueron tratados con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (triangulos abiertos) dos días después de inyección celular y el volumen tumoral (eje-y, mm^3) fue medido en el tiempo (eje-x, días después de inyección celular). El tratamiento con anticuerpos 59R1 singificativamente inhibió la la formación tumoral en comparación con el control. ($p < 0.001$) (B) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe Formación de Tumores de Mama T3. Ratones NOD/SCID injectados con células tumorales de mama T3 fueron tratados con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (triangulos abiertos) dos días después de inyección celular, y el volumen tumoral (eje-y, mm^3) fue medido en el tiempo (eje-x, días después de inyección celular). El tratamiento con anticuerpos 59R1 singificativamente inhibió la formación tumoral en comparación con el control. ($p < 0.001$) (C) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe el Crecimiento de Tumores del Colon Colo-205. Ratones hembra *bg/nu XID* inmunodeficientes de 6-8 semanas de edad en un medio CD-1 Swiss inyectados con células tumorales de colon Colo-205 fueron tratados con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (diamantes) después que el volumen tumoral alcanzó un tamaño entre 65 y 200 mm^3. El volumen tumoral medio (eje-y, mm^3) fue medido en el tiempo (eje-x, días después de inyección celular). El tratamiento con anticuerpos 59R1

inhibió crecimiento tumoral en comparación con el control (*** $p < 0.001$ después del día 40). (D) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe el Crecimiento de Tumores Pancreaticos PN4. Ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales PN4 pancreaticas fueron tratados con el anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (diamantes) después que el volumen tumoral alcanzó un tamño entre 65 y 200 mm^3. El volumen tumoral medio (eje-y, mm^3) fue medido en el tiempo (eje-x, días después de inyección celular). El tratamiento con anticuerpos 59R1 inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el control (*** $p < 0.001$ después del día 70). (E) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe el Crecimiento de tumores de mama PE13. Ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales de mama PE13fueron tratados con el anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (diamantes) después que el volumen tumoral alcanzó un tamaño entre 65 y 200 mm^3. El columen tumoral medio (eje-y, mm^3) fue medido en el tiempo (eje-x, días después de inyección celular). El tratamiento con anticuerpos 59R1 inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el control (* $p < 0.05$ después del día 57). (F) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe el Crecimiento de Tumores de Mama T3. Ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales de mama T3fueron tratados con anticuerpo de control (barras sólidas) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (barras abiertas) después que volumen tumoral alcanzó un tamaño entre 65 y 200 mm^3. El volumen tumoral medio fue medido en las días 18, 25, 39, y 42 después de la inyección de células. El tratamiento con anticuerpos 59R1 inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el control (*** $p < 0.001$ en el día 42).

Figura 6: El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 retarda la recurrencia de tumores de mama B51 después de tratamiento con paclitaxel.

Figura 7: El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 disminuye la frecuencia de células madre cancerígenas en tumor de mama B51.

Figura 8: En combinación con gemcitabina,el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 inhibe el Crecimiento de Tumores Pancreaticos PN4.

Figura 9: El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjero de melanoma M4.

Figura 10: El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 inhibe el crecimiento de tumores del colon C28 solo o en combinación con irinotecan.

Figura 11: El anticuerpo 59R1 IgG2 significativamente inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjertos tumorales humanos establecidos *in vivo*. Tumores establecidos Colo-205 (A), C8 (B), PN8 (C), B34 (D), B39 (E), B44 (F), PE-13 (G) y T1 (H) (s.c, n=10 por grupo) fueron tratados a 15mg/kg una vez a la semana con los anticuerpos indicados (1B711, el anticuerpo de control LZ-1, cuadrados negros; 59R1, triangulos negros; AVASTIN, círculos negros; AVASTIN + 59R1, diamantes negros). El volumen tumoral (eje-x) es graficado sobre el tiempo (eje-y). En el modelo de xenoinjerto Colo-205, la terapia de combinación de 59R1 con AVASTIN fue significativamente más efectiva que cualquier tratamiento con anticuerpo solo. En las Figuras 11B-11H, los asteriscos indican inhibición significativa de crecimiento tumoral en el día mostrado: *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$, prueba t de Student; Simbolos, medio; barras, SEM.

Figura 12: Niveles de expresión relativa de genes seleccionados son significativamente regulados por tratamiento 59R1 en varios modelos tumorales de xenoinjerto. Niveles de expresión de HEYL (A), Notch3 (B), RGS5 (C), ANGPT1 (D) y ANGPT2 (E) fueron individualmene probados mediante análisis TaqMan® a partir de modelos de xenoinjerto previamente probados. Notablemente, la falta de estrógeno (ne) anula el efecto de 59R1 en reducción de expression ANGPT1 y ANGPT2 en estroma hospedero de ratones de cultivo T1. Los círculos abiertos corresponden a tumores individuales analizados. Línea horizontal, promedio.

Figura 13: El gen PTEN supresor tumoral es suprimido en muchos de los tumores de mama en los cuales 59R1 mostró eficacia anti-tumoral. El exón PTEN, distribución de sonda Affymetrix, y las supresiones en el gen PTEN en el cromosoma 10 son mostrados. Las barras grises gruesas y delgadas indican las supresiones homócigas y heterócigas de los fragmentos cromosómicos, respectivamente.

Figura 14. Mapeo de epitopos de anticuerpo 59R1. (A) Alineación protéica de homólogos Notch humanos. La alineación fue realizada mediante el Software Manajador de Clones. La repetición EGF 10 de Notch1, Notch2, y Notch4 humano y el EGF equivalente en Notch3 humano, EGF9, es como se indicó. el área encerrada indica una región que contiene uno o más aminoácidos que conforman al menos parte del epitopo 59R1 como se definió mediante la fijación FACS del anticuerpo 59R1 IgG2 a un mutante hNotch2 H385N AL 388-89 SN (Figura 14B) y a un constructo hNotch1 en el cual aa 382-

386 ha sido mutado para corresponder a la secuencia hNotch2 (Figura 14C). (B) El anticuerpo 59R1 IgG2 se fija a hNotch2, pero no a un mutante hNotch2 en el cual ciertos residuos EGF 10 han sido mutados a residuos hNotch1 (H385N AL 388-89 SN). (C) El anticuerpo 59R1 IgG2 no se fija a hNotch1, pero se fija a un mutante hNotch1 en el cual ciertos residuos EGF 10 (aa 382-387) han sido mutados para corresponder a los residuos hNotch2 385-389.

Figura 15: Caracterización *in vitro* de 59R5. (A) La Figura 15A muestra que el anticuerpo 59R5 es capaz de bloquear señalización inducida por ligandos de Notch2 y Notch3. Las células tumorales PC3 fueron temporalmente transfectadas con receptor Notch humano o murino (hN2, Notch2 humano; mN2, Notch2 murino; hN3, Notch3 humano; mN3, Notch3 murino) y constructo de reportero inducible GFP. Las células transfectadas fueron incubadas con con diferentes concentraciones de anticuerpo 59R1 y 59R5 en la presencia de DLL4 Fc pasivamente inmovilizado. (B) La Figura 15B muestra que 59R5 se fija a un epitopo similar a 59R1. Las células HEK293 fueron temporalmente transfectadas con vectores de expresión que codifican Notch2 humano, Notch1 humano, o Notch1 humano con residuos 382-386 mutados a los correspondientes residuos Notch2 humano. Las células también fueron co-transfectadas con un plásmido que codifica proteína fluorescente verde (GFP) para marcar aquellas células que recibieron plásmido transfectado. Las células fueron incubadas con 59R1 o 59R5 y anticuerpo secundario fluorescente y luego examinadas mediante FACS. Las regiones resaltadas por los recuadros indican que las células transfectadas con el vector de expresión Notch indicado fueron capaces de fijarse a 59R1 o 59R5.

Figura 16. El anticuerpo receptor Notch 59R5 inhibe la formación y crecimiento tumoral *en vivo*. Figura 16A muestra tratamiento *in vivo* de células tumorales de mama PE13 con anticuerpo 59R5. La Figura 16B muestra tratamiento *in vivo* de células de colon C28 con anticuerpo 59R5. La Figura 16C muestra tratamiento *in vivo* de células de colon Colo205con anticuerpo 59R5.

Figura 17. Tratamiento *in vivo* de tumores que utilizan anticuerpo 59R5 Notch2/3 en tratamiento de combinación. (A) Los ratones fueron inyectados con células tumorales pancreáticas PN8. Los tumores fueron dejados crecer durante 33 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 120 mm^3. Los animales fueron tratados con gemcitabina a 20

mg/kg una vez por semana durante cuatro semanas en combinación con bien sea control Ab (cuadrados), 59R1 (triangulos), o 59R5 (círculos). (B) Los ratones fueron inyectados con células tumorales de mama PE13. Los tumores fueron dejados crecer durante 40 días antes de la iniciación de los tratamientos. Los animales fueron tratados con TAXOL a 15 mg/kg dos veces por semana durante 5 semanas, más cualquiera anticuerpo de control (cuadrados) o 59R5 (círculos). Después de 5 semanas, los tratamientos con TAXOL fueron detenidos y y los tratamientos con anticuerpos continuaron.

Figura 18. Regulación de expresión génicaen tumores después tratamiento con anticuerpo 59R5. La Figura 18 muestra niveles de expresión de genes seleccionados en células estromales y genes humanos seleccionados en células tumorales PE13 después de tratamiento con 59R1, 59R5, o anticuerpo de control.

Figura 19. Reducción de frecuencia de células madre de cáncer de mama PE13 mediante 59R1. (A) Los tumores establecidos fueron tratados con anticuerpo de control, taxol más anticuerpo de control, 59R1, o taxol más 59R1. Los tumores fueron cosechados después tres semanas de tratamiento, procesados y las titulaciones seriales de células humanas de cada uno de cuatro grupos de tratamiento fueron transplantadas a un nuevo grupo de ratones (n =10 por dosis celular). La tasa de crecimiento celular fue determinada después de 75 días. La tasa de crecimiento celular después 75 días de crecimiento fue utilizada para calcular la frecuencia CSC utilizando el programa L-calc (Stem Cell Technologies, Inc.). (B) Frecuencia de células madre cancerígenas en tumores de mama PE13 después de tratamiento con 59R1 y/o taxol. (C) Frecuencia de células madre cancerígenas en tumores pancreaticos PN4 después de tratamiento con 59R1 y/o gemcitabina. (D) Frecuencia de células madre cancerígenas en tumores de mama PE13 después tratamiento con 59R5 y/o taxol. Un único asterisco indica una diferencia estadisticamente significativa ($p < 0.05$) vs. el grupo tratado con anticuerpo de control y un asterisco doble indica una diferencia significativa vs. el grupo tratado con taxol y anticuerpo de control.

DESCRIPCION DETALLADA DEL INVENTO

El presente invento proporciona agentes novedosos, incluyendo, pero sin limitar a polipéptidos tales como anticuerpos, que se fijan a uno o más receptores Notch humanos,

tales como Notch2 y/o Notch3. Los agentes fijadores Notch incluyen antagonistas de los receptores Notch humanos. Polipéptidos y polinucleotidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes fijadores Notch, y métodos para preparar los agentes fijadores Notch también se proporcionan. Además se proporcionan métodos para utilizar los agentes fijadores Notch novedosos, tales como métodos de inhibir crecimiento tumoral, inhibir angiogenesis, y/o tratar cáncer u otra enfermedad relacionada con angiogenesis.

El presente invento además identifica moléculas (ej., anticuerpos) que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*. La región fijadora de ligados de Notch, la cual es necesaria y suficiente para la fijación de ligandos, ha sido identificada como repeticiones EGF 11 y 12, indicando que esta región del el receptor Notch es importante en señalización Notch y tumorigénesis (Rebay, 1991, *Cell* 67:687; Lei, 2003, *Dev.* 130:6411; Hambleton, 2004, *Structure* 12:2173). Inesperadamente, se ha encontrado que los anticuerpos que se fijan fuera del dominio fijador de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch humano inhiben el creciiento de células tumorales *in vivo* (ver Solicitud de Patente estadounidense No. 2008/0131434, incorporada en la presente como referencia en su totalidad). Así,los anticuerpos que se fijan fuera del dominio fijador de ligandos del dominio extracelular de uno o más de los receptores Notch humanos—Notch1, Notch2, Notch3, y Notch4—tienen valor como terapéuticos potenciales para el cáncer.

Se ha identificado un anticuerpo que específicamente se fija a un epitopo que contiene residuos dentro de la repetición EGF 10 de Notch2 humano (Ejemplos 1 y 3 y Figuras 3A-3C). El anticuerpo, 59R1, inhibe la fijación de ligando a Notch2 (Ejemplo 1 y Figuras 1A-1D) e inhibe señalización Notch2 inducida por ligandos (Ejemplo 4 y Figura 4A-4C), no obstante la fijación a Notch2 en una región fuera de región fijadora de ligandos. 59R1 también específicamente fija Notch3 humano (Ejemplo 2 y Figura 2). Se ha encontrado que el anticuerpo evita o inhibe el crecimiento de células tumorales *en vivo* en una variedad de diferentes modelos de xenoinjerto, bien sea solo o en combinación con un segundo angente anti-cáncer (Ejemplos 5, 6, 7, y 9 y Figuras 5A-F, 6, 8-10, y 11A-H). También se ha mostrado que el anticuerpo reduce la tumorigenicidad de un tumor *in vivo* en múltiples modelos de xenoinjerto al reducir la frecuencia de células madre cancerígenas

(Ejemplos 8 y 23 y Figuras 7 y 19A-C). Además, se encontró que el tratamiento con 59R1 regula de manera negativa la expresión de RGS5 (un marcador para pericitos y/o células de musculo liso vascular), Notch3, y HeyL en el estroma de varios tumores (Ejemplo 10 y Figuras 12A-E) y y regula de manera positiva hipoxia en tumores de mama y colon (Ejemplo 11). Sin estar limitados por la teoria, estos datos indican que el anticuerpo 59R1 tiene un efecto inhibitorio sobre angiogénesis tumoral que se debe, al menos en parte, a modulación de la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular. También se encontró que el tratamiento con 59R1 regula genes adicionales en tumores de mama. También se encontró que rutas génicas de ciclo celular, genes activadores de myc y varios grupos génicos de células madre fueron regulados de manera negative por 59R1 (Ejemplo 22).

También se ha desarrollo un anticuerpo humano adicional, 59R5. 59R5 tiene propiedades que son similares a 59R1, tales como afinidad de fijación similar a Notch2 y Notch3 y similitudes o translape en sus epítopos (Ejemplo 13 y Figura 15B). Se ha mostrado que el anticuerpo 59R5 tiene actividad similar a59R1 para bloquear señalización Notch2 y Notch 3 (Ejemplo 13 y Figura 15A). También se ha mostrado que el anticuerpo 59R5 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en varios modelos de xenoinjerto, bien sea solo o en combinación con un segundo angente anti-cáncer (Ejemplos 14 y 15 y Figuras 16A-C y 17A-B). Además, se encontró que el tratamiento con 59R5, tipo 59R1, regula de manera negativa la expresión de RGS5, Notch3, y HeyL en el estroma de varios tumores, y también se encontró que 59R5 regula la expresión de genes humanos ID4, EDNRA, y EGLN3 en células tumorales en una medida similar a 59R1 (Ejemplo 16). Además se mostró que 59R5 reduce la tumorigenicidad en vivo en un modelo de xenoinjerto al reducir la frecuencia de células madre cancerígenas (Ejemplo 23 y 19D).

Definiciones

Un "antagonista" de un receptor Notch es un término que incluye cualquier molécula que parcial o completamente bloquea, inhibe, o neutraliza una actividad biológica de la ruta Notch. Moléculas antagonistas apropiadas específicamente incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos antagonistas.

El término "anticuerpo" se utiliza para referirse a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y específicamente se fija a un blanco, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleotido, lípido, o combinaciones de los anteriores etc., por medio de al menos un sitio de reconocimiento de antígenos dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina . Como se utiliza en la presente, el término incluye anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, y Fragmentos Fv), mutantes Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígenos siempre y cuando los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, o subclases (isotopos) de las mismas(ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2), con base en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada conocidos como alfa, delta, epsilón, gama, y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen diferentes estructuras y configuraciones tridimensionales de subunidades bien conocidas. Los anticuerpos pueden ser despojados o conjugados a otras moléculas tales como toxinas, radioisotopos, etc.

Como se utiliza en la presente, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a la determinación antigénica de regiones variables de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab', F(ab')2, y fragmentos Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un "anticuerpo Fv" se refiere al fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y fijación de antígenos completos bien sea como dos cadenas, en las cuales un dominio variable de cadena pesada y de cadena liviana forma un dímero no covalente, o como una cadena sencilla (scFv), en la cual un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana están covalentemente unidos por un enlazador peptídico flexible de manera que las dos cadenas se asocian en una estructura dimérica similar. En esta configuración las regiones determinantes de complementariedad

(CDRs) de cada dominio variable interactúan para definir la especificidad de fijación de antígenos del dimero Fv. Alternativamente un único dominio variable (o mitad de un Fv) puede utilizarse para reconocer y fijar antígeno, aunque generalmente con afinidad menor.

Un "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en la presente se refiere a la población de anticuerpos homogéneos involucrados en el reconocimiento y fijación altamente específicos de un determinante antigénico sencillo, o epitopo. Esto contrasta con anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca ambos anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa así como también fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte del anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígenos. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos preparados en cualquier número de formas incluyendo, pero sin limitar a, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, y animales transgénicos.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (ej., murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específica, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos desde la región determinante de complementariedad (CDR) son reemplazados por residuos desde la CDR de una especie no humana (ej., ratón, rata, conejo, hamster, etc.) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas instancias, los residuos de región de marco Fv (RF) de una inmunoglobulina humana son reemplazados con con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede además modificarse por la sustitución de residuo adicional bien sea en lala región de marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar anticuerpo especificidad, afinidad, y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la

inmunoglobulina no humana mientras todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de concenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o dominio (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados son descritos en Patente estadounidense No. 5,225,539, incorporada en la presente como referencia.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena liviana de anticuerpo o la región variable de la cadena pesada de anticuerpo, bien sea solas o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y cadena liviana cada una constan de cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDRs en cada cadena son mantenidas juntas en proximidad estrecha por las FRs y, con las CDRs desde la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio fijador de antígenos de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar CDRs: (1) un enfoque basado en variabilidad de secuencias de especies cruzadas (i.e., Kabat . Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, (5th ed., 1991, Instituto Nacional de Salud, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani 1997, *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Además, las combinaciones de estos dos enfoques algunas veces se utilizan en el estado de la técnica para determinar CDRs.

El término "anticuerpo humano" como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia aminoácida que corresponde a un anticuerpo producido por un humano hecho utilizando cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anicuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o liviana humana tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena liviana murina y cadena pesada humana.

"Anticuerpos híbridos" son moléculas de inmunoglobulina en las cuales pares de cadenas pesadas y livianas desde anticuerpos con diferentes regiones determinantes antigénicas son ensambladas juntas de manera que dos epitopos diferentes o dos antígenos diferentes pueden reconocerse y fijarse mediante el tetrámero resultante.

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en donde la secuencia aminoácida de la molécula inmunoglobulina es derivada a partir de dos o más especies. Típicamente, la región variable de ambas cadenas livianas y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados a partir de una especie de mamíferos (ej. ratón, rata, conejo, etc.) con especificidad, afinidad y capacidad deseadas mientras las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados a partir de otros (usualmente humanos) para evitar producir una respuesta inmune en esa especie.

Los términos "epitopo" o "determinante antigénico" se utilizan intercambiablemente en la presente y se refieren a aquella porción de un antígeno capaz de ser reconocido y específicamente fijado por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epitopos pueden formarse ambos a partir de aminoácidos adyacentes y aminoácidos no adyacentes juxtapuestos por doblamiento terciario de una proteína. Los epitopos formados a partir de aminoácidos adyacentes típicamente son retenidos ante desnaturalización de proteínas, mientras los epitopos formados por doblamiento terciario típicamente son perdidos ante desnaturalización de proteínas. Un epitopo típicamente incluye al menos 3, y más usualmente, al menos 5 o 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial.

La competencia entre anticuerpos es determinada por un ensayo en el cual la inmunoglobulina bajo estudio inhibe la fijación específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Numerosos tipos de ensayos de fijación competitiva son conocidos, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competencia tipo sandwich (ver Stahli, 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA biotina-avidina de estado sólido (ver Kirkland, *J. Immunol.* 1986, 137:3614-3619); ensayo rotulado directo de fase sólida, ensayo sandwich rotulado direco de fase sólida (ver Harlow y Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA de rótulo directo de fase sólida utilizando rótulo I-125 (ver Morel, 1988, *Molec. Immunol.* 25(1):7-15); EIA biotina-avidina de estado sólido (Cheung, 1990, *Virology* 176:546-552); y RIA rotulado directa (Moldenhauer, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Típicamente, tal ensayo involucra el uso de antígeno purificado fijado a una superficie sólida o células que transportan cualquiera de estas, una inmunoglobulina de prueba no rotulada y una

inmunoglobulina de referencia rotulada. La inhibición competitiva es medida al determinar la cantidad de rotulo fijado a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante ensayo de competencia (anticuerpos competentes) incluyen anticuerpos que se fijan al mismo epitopo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se fijan a un epitopo adyacente suficientemente próximo al epitopo fijado por el anticuerpo de referencia para que ocurra hidratación estérica. Usualmente, cuando un anticuerpo competente está presente en exceso, inhibirá fijación específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 50 o 75%.

Que un anticuerpo "selectivamente se fije" o "específicamente se fije " a un epitopo o receptor significa que el anticuerpo reacciona o se se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de las anteriores al epitopo o receptor que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. "Selectivamente se fije " o "específicamente se fije" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se fija a una proteína con una K_D de aproximadamente 0.1 mM o menos, más usualmente aproximadamente 1 μM o menos. "Selectivamente se fija" o "específicamente se fija" significa a veces que un anticuerpo se fija a una proteína con una K_D de aproximadamente 0.1 mM o menos, a veces aproximadamente 1 μM o menos, a veces aproximadamente 0.1 μM o menos, a veces aproximadamente 0.01 μM o menos, y a veces aproximadamente 1 nM o menos. Debido a la identidad de secuencias entre proteínas homólogas en diferentes especies, la fijación específica puede incluir un anticuerpo que reconoce un receptor Notch en más de una especie. Igualmente, debido a la homología entre diferentes receptores Notch (ej., Notch2 y Notch3) en ciertas regiones de las secuencias polipéptidas de los receptores, la fijación específica puede incluir un anticuerpo que reconoce más de un receptor Notch. Se entiende que, en ciertas realizaciones, un anticuerpo o fracción fijadora que específicamente se fija a un primer blanco puede o no específicamente fijarse a un segundo blanco. Como tal, "fijación específica" no necesariamente requiere (aunque puede incluir) fijación exclusiva, es decir, fijación a a un único blanco. Así, un anticuerpo puede, en ciertas realizaciones, específicamente fijarse a más de un blanco (ej., Notch2 humano y Notch3). En ciertas realizaciones, los múltiples blancospueden ser fijados por el mismo sitio fijador de

antígenos sobre el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede, en ciertas instancias, comprender dos dos sitios fijadores de antígenos idénticos, cada uno de los cuales específicamente fija dos o más receptores Notch humanos (ej., Notch2 humano y Notch3). En ciertas realizaciones alternativas, un anticuerpo puede ser biespecífico y comprender al menos dos sitios fijadores de antígenos con diferentes especificidades. A manera de ejemplo no limitante, un un anticuerpo biespecífico puede comprender un sitio fijador de antígenos que reconoce un epitopo sobre un receptor Notch, tal como Notch2 humano, y además comprender un segundo sitio fijador de antígenos diferente que reconoce un epitopo diferente sobre un segundo receptor Notch, tal como Notch3 humano. Generalmente, pero no necesariamente, referencia a "fijación" en la presente signfica "fijación específica."

Como se utiliza en la presente, los términos "fijación no específica" y "fijación fundamental" cuando se utilizan en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido se refieren a una interacción que no depende de la presencia de una estructura particular (es decir,, el anticuerpose fija a proteínas en general más que a una estructura particular tal como un epitopo).

Los términos "aislado" o "purificado" se refieren al material que es sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente le acompañan en su estado nativo. Pureza y homogeneidad típicamente se determinan utilizando técnicas de química analítica tales como electroforesis de gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto desempeño. Una proteína (ej., un anticuerpo) o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación es sustancialmente purificado. En particular, un ácido nucleico aislado es separado desde marcos de lectura abiertos que naturalmente bordean el gen y codifican proteínas diferentes de la proteína codificada por el gen. Un anticuerpo aislado es separado desde otras proteínas no inmunoglobulina y desde otras proteínas de inmunoglobulina con diferente especificidad de fijación de antigenos. También puede significar que el ácido nucleico o proteína es al menos 85% puro, al menos 95% puro, y en algunas realizaciones, al menos 99% puro.

Como se utilizan en la presente, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a describir la condición fisiológica en mamíferos en los cuales una población de células se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se

limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar escamoso, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreatico, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer hepático, cáncer de la vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer prostático, cáncer vulval, cáncer tiroideo, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Los términos "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa" se refieren a trastornos asociados con proliferación celular anormal tal como cáncer.

"Tumor" y "neoplasma" como se utilizan en la presente se refieren a cualquier masa de tejido que resulta de crecimiento o proliferación celular excesiva, bien sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones pre-cancerosas.

"Metastasis" como se utiliza en la presente se refiere al proceso mediante el cual un cáncer se disemina o transfiere desde el sitio de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva locación. Una célula "metastática" o "metastásica" es aquella que pierde contacto adhesivo con células vecinas y migra vía el torrente sanguineo o linfa desde el sitio primario de enfermedad para invadir estructuras corporales vecinas.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (ej., un mamífero), incluyendo, pero sin limitar a humanos, primates no humanos, roedores, y similares, el cual es el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan intercambiablemente en la presente en referencia a un sujeto humano.

Los términos "célula madre cancerosa" o "célula madre tumoral" o "célula madre tumoral sólida" se utilizan intercambiablemente en la presente y se refieren a una población de células a partir de un tumor sólido que: (1) tienen amplia capacidad proliferativa; 2) son capaces de división celular asimétrica para generar una o más clases de progenie diferenciada con potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para auto-renovación o auto-mantenimiento. Estas

propiedades de "células madre cancerígenas" o "células madre tumorales" o "células madre tumorales sólidas" confieren a estas células madre cancerígenas la capacidad para formar tumores palpables ante transplante serial a un ratón inmunocomprometido en comparación con la mayoría de células tumorales que fallan para formar tumores. Las células madre cancerígenas experimentan auto-renovación versus diferenciación en una manera caótica para formar tumores con tipos celulares anormales que pueden cambiar en el tiempo a medida que ocurren mutaciones.

Los términos "célula cancerígena" o "célula tumoral" y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas desde un tumor incluyendo tanto células no tumorigénicas, las cuales comprenden el volume de la población celular tumoral, como células madre tumorigénica (células madre cancerígenas).

Como se utiliza en la presente "tumorigénico" se refiere a las características funcionales de una célula madre tumoral sólida incluyendo las propiedades de auto-renovación (dar origen a células madre cancerígenas tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar todas las otras células tumorales (dar origen a células diferenciadas y por lo tanto células tumorales no tumorigénicas) que permiten a las células madre tumorales sólidas formar un tumor.

Como se utiliza en la presente, la "tumorigenicidad" de un tumor se refiere a la capacidad de una muestra aleatoria de células desde el tumor para formar tumores palpables ante transplante serial en ratones inmunocomprometidos.

Como se utiliza en la presente, los términos "marcador cancerígeno de células madre" o "marcador de células madre cancerígenas" o "marcador tumoral de células madre" o "marcador de células madre tumorales sólidas" se refieren a un gen o genes o un proteína, polipéptido, o péptido expresado por el gen o genes cuyo nivel de expresión, solos o en combinación con otros genes, está correlacionado con la presencia de células cancerígenas tumorigénicas comparación con células no tumorigénicas. La correlación puede relacionarse con bien sea una expresión aumentada o disminuida del gene (ej., niveles aumentados a disminuidos de ARNm o el péptido codificado por el gen).

Los términos "firma de genes de células madre cancerosas" o "firma de genes de células madre tumorales" o "firma de células madre cancerosas" se utilizan intercambiablemente en la presente para referirse a formas genéticas que comprenden

genes diferencialmente expresados en células madre cancerígenas comparadas con otras células o población de células, por ejemplo tejido epitelial de mama normal. En algunas realizaciones las firmas de genes de células madre cancerígenas comprenden genes diferencialmente expresados en células madre cancerígenas versus epitelio de mama normal mediante un cambio de pliegue, por ejemplo por expresión reducida y/o elevada 2 veces, y además limitadas por utilizanción de un análisis estadístico tal como, por ejemplo, por el valor P de una prueba-t a través de múltiples muestras. En otra realización, los genes diferencialmente expresados en células madre cancerígenas están divididos en firmas de genes de células madre cancerígenas con base en la correlación de su expresión con un gen elegido en combinación con supliegue o porcentaje de cambio de expresión. Las firmas de células madre cancerígenas son predictivas tanto retrospectivamente y prospectivamente de un aspect de variabilidad clínica, incluyendo pero sin limitar a metastasis y muerte.

El término "prueba genética" como se utiliza en la presente se refiere a procedimientos mediante los cuales se analiza la composición genética de un paciente o una muestra tumoral de paciente. El análisis puede incluir detección de ADN, ARN, cromosomas, proteínas o metabolitos para detectar genotipos heredables o relacionados con enfermedad somática o cariotipos para propósitos clínicos.

Como se utiliza en la presente, los términos "biopsia" o "tejido de biopsia" se refieren a una muestra de tejido o fluido que es retirado desde un sujeto con el propósito de determinar si la muestra contiene tejido canceroso. En algunas realizaciones, el tejido de biopsia o fluido se obtiene porque se sospecha que el sujeto tiene cáncer. Luego el tejido de biopsia o fluido se examina para verificar la presencia o ausencia de cáncer.

Como se utiliza en la presente un "vehículo farmacéutico aceptable" se refiere a cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo de una composición farmacéutica tal como un anticuerpo, permite al anticuerpo, por ejemplo, retener su actividad biológica. Además, un "vehículo farmacéutico aceptable" no dispara una respuesta inmune en un sujeto receptor. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándares tales como una solución salina amortiguada por fosfato, agua, y varias emulsiones de aceite/agua. Algunos diluyentes para administración parenteral o en aerosol solución salina amortiguada por fosfato o solución salina normal (0.9%).

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleotido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco efectivo para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración de células cancerígenas en organos periféricos; inhibir y detener metástasis tumoral; inhibir y detener crecimiento tumoral; aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas asociados con cáncer, o una combinación de tales efectos sobre células cancerígenas. En la medida que el fármaco previene crecimiento y/o elimina células cancerígenas existentes, puede conocerse como citostático y/o cototóxico.

Términos tales como "tratar" o "tratamiento" o "para tratar" o "aliviar" o "para aliviar" se refieren a 1) medidas terapéuticas que curan, retardan, disminuyen síntomas de, y/o detienen la progresión de un trastorno o condición patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen o retardan el desarrollo de una condición o trastorno patológico objetivo. Por lo tanto aquellos con necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en quienes el trastorno va a ser prevenido. En algunas realizaciones, un sujeto es exitosamente "tratado" para cáncer según los métodos del presente invento si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción en el número de células cancerígenas o ausencia completa de células cancerígenas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o ausencia de infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos incluyendo la diseminación de cáncer en tejido suave y hueso; inhibición de o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas; y mejora en la calidad de vida. Así, en ciertas realizaciones, el tratamiento de cáncer comprende inhibición de crecimiento tumoral en un sujeto.

Como se utiliza en la presente, los términos "polinucleotido" o "ácido nucléico" se refieren a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades nucleotidas (ribonucleotido o desoxiribonucleotido o variantes estructurales relacionadas) unidas vía enlaces de fosfodiéster, incluyendo pero sin limitar a, ADN o ARN. El término contempla secuencias que incluyen cualquiera de los análogos base conocidos de ADN y ARN

incluyendo, pero sin limitar a,
4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil
2-thiouracilo, 5- carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina,
1- metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-methoxyaminometil 2-thiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, metiléster del ácido uracil-5-oxiacetico, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2 thiouracilo, 2-thiouracilo, 4-thiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, y 2,6-diaminopurina.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (ej., ADN) que comprende secuencias codificadoras necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o ARN (ej., rARN, tARN). El polipéptido puede codificarse mediante una secuencia codificadora de longitud completa o mediante cualquier porción de la secuencia codificadora siempre y cuando la actividad deseada o propiedades funcionales (ej., actividad enzimática, fijación de ligandos, transducción de señales, inmunogenicidad, etc.) del del fragmento o polipéptido de longitud completa son retenidas. El término también abarca la región codificadora de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificadora sobre ambos los extremos 5' y 3'por una distancia de aproximadamente 1 kb o más sobre cualquier extremo tal que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Secuencias localizadas 5' de la región codificadora y presentes sobre el ARNm son conocidas como secuencias no traducidas 5'. Las secuencias localizadas 3' o corriente abajo de la región codificadora y presentes sobre el ARNm son conocidas como secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto formas de cADN como formas genómicas un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificadora interrumpida con secuencias no codificadoras denominadas "intrones" o "regions de intervención" o "Secuencias de Intervención". Intrones son

segmentos de un gen que son transcritos en ARN nuclear (hnRNA); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como aumentadores. Los intrones son retirados o "empalmados fuera" desde el transcripto nuclear o primario; por lo tanto los intrones están ausentes en el transcripto de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante traducción para especificar la secuencia u orden de aminoácidos en un naciente polipéptido. Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas sobre ambos el extremo 5' y 3' de las secuencias que están presentes sobre el transcripto de ARN. Estas secuencias son conocidas como secuencias o regiones "colindantes"(estas secuencias colindantes están localizadas 5' o 3' a las secuencias no traducidas presentes sobre el transcripto de ARNm). la región colindante 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y aumentadores que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región colindante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de transcripción, escisión post transcripcional, y poliadenilación.

El término "recombinante" cuando se utiliza con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector han sido modificados por la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo, la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula es derivada a partir de una célula modificada así. Por lo tanto, ej., las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no-recombinante) de la célula o expresan genes nativos que son overexpresados o de otra manera anormalmente expresados tales como, por ejemplo, expresados como fragmentos de ocurrencia no natural o variantes de unión. Por el término "ácido nucléico recombinante" en la presente se hace referencia a ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, ej., utilizando polimerasas y endonucleasas, en una forma normalmente no encontrada en la naturaleza. En esta forma, se logra la unión de diferentes secuencias. Así un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* al ligar moléculas de ADN que normalmente no están unidas, se consieran ambos recombinants para los propósitos de este invento. Se entiende que una vez un ácido nucleico recombinante es hecho e introducido en un organismo o célula huésped, éste se replicará de manera no recombinante, es decir, utilizando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped preferiblemente a manipulaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácido nucleicos, una

vez producidos de manera recombinante, aunque se replican subsiguientemente de manera no recombinante, aún se consideran recombinantes para los propósitos del invento. De manera similar, una "proteína recombinante" es una proteína hecha utilizando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se ilustró anteriormente.

Como se utiliza en la presente, el término "vector" se utiliza en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmentos de ADN de una célula a otra. El término "vehículo" algunas veces se utiliza intercambiablemente con "vector." Los vectores a menudo se derivan a partir de plásmidos, bacteriofagos, o virus vegetales o animales.

Como se utiliza en la presente, el término "expresión génica" se refiere a al proceso de convertir información genética codificada en un gen a ARN (ej., ARNm, ARNr, tARN, o snARN) a través de transcripción" del gen (ej., vía la acción enzimática de una polimerasa de ARN), y para genes que codifican proteínas, en proteína a través de "traducción" de ARNm. La expresión de genes puede regularse en muchas etapas en el proceso. "Regulación positiva" o "activación" se refiere a regulación que aumenta la producción de productos de expresión génica (ej., ARN o proteína), mientras "regulación negativa" o "represión" se refiere a regulación que disminuye producción. Las moléculas (ej., factores de transcripción) que están involucradas en regulación positivaq o regulación negative a menudo se conocen como "activadores" y "represores", respectivamente.

Los términos "polipéptido" o "péptido" o "proteína" o "fragmento de proteína" se utilizan intercambiablemente en la presente para referirse a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos se aplican a polimeros aminoácidos en los cuales uno o más residuos aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de ocurrencia natural, así como también a polímeros aminoácidos de ocurrencia natural y polimeros aminoácidos que no ocurren de manera natural.

El término "aminoácido" se refiere a se refiere a aminoácidos naturales o sintéticos, así como también a análogos aminoácidos y miméticos aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados mediante el código genético, así como también aquellos aminoácidos que son modificados posteriormente, ej., hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, y O-fosfoserina.

Análogos aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de ocurrencia natural, ej., un carbono alfa que es fijado a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, ej., homoserina, norleucina, sulfoxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (ej., norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura básica química que aminoácido natural. Miméticos aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido natural.

"Variantes modificadas de manera conservadora" se aplica tanto a secuencias aminoácidas como a secuencias de ácidos nucléicos. "Variantes aminoácidas" se refiere a secuencias aminoácidas. Con respect a secuencias particulares de ácidos nucléicos, variantes modificadas de manera conservadora se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias aminoácidas idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia aminoácida, a secuencias asociadas o esencialmente idénticas (ej., naturalmente adyacentes). Debido a la degradación del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido alanina. Así, en cada posición donde una alanina es especificada por un codon, el codon puede alterarse a los otros codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas," las cuales son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente la cual codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Se reconoce que en ciertos contextos cada codon en un ácido nucleico (excepto AUG, el cual es comúnmente el único codon para metionina, y TGG, el cual es comúnmente el único codon para triptofano) pueden modificarse para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implicitas en una secuencia descrita con respect al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias actuales de investigación. En cuanto a secuencias aminoácidas, se reconocerá que sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, peptídica, polipeptida, o proteica que altere, agregue o suprima un único aminoácido o un

pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservadora" incluyendo donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido quimicamente natural. Tales variantes modificadas de manera conservadora son además de variantes polimórficas, homólogos de interespecies, y alelos del invento. Las tabletas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares útiles para las sustituciones aminoácidas conservadoras son bien conocidas en el estado de la técnica. Sustituciones conservadoras típicas incluyen: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteina (C), Metionina (M) (ver, ej., Creighton, Proteínas (1984)). (Ver, también, Tabla 1 en la presente).

Como se utiliza en la presente divulgación y reivindicaciones, las formas singulares"un", "una" y "el", "la" incluyen formas plurales a menos que en el contexto claramente se exprese lo contrario.

Se entiende que donde las realizaciones se describen en la presente con el texto "que comprende," también se proporcionan realizaciones de otra manera análogas descritas en términos de "que consta de" y/o "que consiste esencialmente en".

Ciertas realizaciones del presente invento

El presente invento proporciona composiciones y métodos para estudiar, dianosticar, caracterizar, y tratar cáncer. En particular, en ciertas realizaciones, el presente invento proporciona agentes, incluyendo antagonistas, que fijan receptores Notch y métodos para utilizar los agentes o antagonistas para inhibir crecimiento tumoral y tratar cáncer u otra enfermedad en pacientes humanos. En ciertas realizaciones, los antagonistas son anticuerpos que específicamente reconocen uno o más receptores Notch humanos.

En un aspecto, el presente invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e

inhibe crecimiento tumoral, específicamente se fija a una región no figadora de ligandos del dominio extracelular de al menos dos miembros de la familia de receptores Notch. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se fija a una región no figadora de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch2 y/o Notch3. En algunas realizaciones, el anticuerpo se fija a una región no figadora de ligandos del Notch2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo se fija a una región no figadora de ligandos del dominio extracelular de Notch2 y Notch3. En algunas realizaciones, el anticuerpo se fija a una región no figadora de ligandos del Notch3 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo se fija a Notch1 y/o Notch4.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento turmoral es un anticuerpo quimérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento turmoral es un anticuerpo humanizado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral es un anticuerpo humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral es una anticuerpo monoespecífico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral es un anticuerpo biespecífico. En ciertas realizaciones, el presente invento proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones el presente invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos que comprende repeticiones EGF 1-10 del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones el presente invento proporciona un anticuerpo que específicamente se

fija a una región no fijadora de ligandos que comprende repetición EGF 10 (o equivalente) del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones el presente invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos que comprende repeticiones EGF 13-36 del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. Ciertas realizaciones proporcionan un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos que comprende repeticiones EGF 4 del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. Ciertas realizaciones proporcionan un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos que comprende repetición EGF 13 del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos que comprende el dominio LNR-HD e inhibe crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones el presente invento proporciona un método de tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de una proteína receptora Notch humana e inhibe crecimiento tumoral en el sujeto. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a al menos dos miembros de la familia de receptores Notch e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch2 y/o Notch3 e inhibe crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo quimérico que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el

método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo humanizado que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo humano que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende repeticiones EGF 1-10 e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende repetición EGF 10 (o el equivalente si se trata de Notch3) e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende repeticiones EGF 13-36 e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende la repetición EGF 4 e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende repetición EGF 4 e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas otras realizaciones, el anticuerpo administrado específicamente se fija al dominio LNR-HD de un receptor Notch humano.

En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo conjugado a una fracción citotóxica que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de

un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral en combinación con terapia de radiación. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral en combinación con quimioterapia. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral a partir de tumor de mama, tumor colorectal, tumor pulmonar, tumor pancreatico, tumor de prostata, o un tumor de cabeza y cuello.

En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende identificar pacientes para tratamiento con el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano utilizando a prueba genética; y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el método de tratar cáncer comprende identificar pacientes para tratamiento con el anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano utilizando una prueba genética que detecta una firma de célula madre cancerosa; y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones, el presente invento proporciona un método de identificar una molécula que se fija a una región no figadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral, el método que comprende: i) incubar the molécula con el dominio no fijador de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano; ii) determinar si the molécula se fija a la región no fijadora de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch humano; y iii) determinar si la

molécula inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el invento proporciona un método de identificar una molécula que se fija a una región no figadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral, el método que comprende: i) incubar the molécula con el dominio no fijador de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende repeticiones EGF 1-10; ii) determinar si la molécula se fija a la región no fijadora de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch humano que comprende repeticiones EGF 1-10; y iii) determinar si la molécula inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el invento proporciona un método de identificar una molécula que se fija a una región no figadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral, el método que comprende: i) incubar la molécula con el dominio no fijador de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende la repetición EGF 10 (o equivalente si se trata de Notch3); ii) determinar si la molécula se fija a la región no fijadora de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch humano que comprende repetición EGF 10 (o equivalente si se trata de Notch3); y iii) determinar si la molécula inhibe crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, el invento proporciona un método de identificar una molécula que se fija a una región no figadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral, el método que comprende: i) incubar la molécula con el dominio no fijador de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende repeticiones EGF 13-36; ii) determinar si la molécula se fija a la región no fijadora de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch humano que comprende repeticiones EGF 13-36; y iii) determinar si la molécula inhibe crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones, el presente invento proporciona una composición farmaceutica que comprende un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones, el presente invento proporciona un método para preparar un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral.

En ciertas realizaciones, el presente invento proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral.

En algunas realizaciones, el invento proporciona un agente (ej., un anticuerpo) que específicamente se fija a un dominio EGF10 (o un equivalente de un dominio EGF10 si se trata de Notch3) de uno o más receptores Notch humanos. En ciertas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente es un antagonista. En ciertas realizaciones, el agente específicamente se fija a EGF10 de Notch2 humano y/o EGF9 de Notch3 humano. EGF9 es el EGF dentro de Notch3 humano que es equivalente a EGF10 en los otros receptores Notch humanos Notch1, Notch2, y Notch4. En ciertas realizaciones, el agente específicamente fija Notch2 humano. En ciertas realizaciones, el agente específicamente fija Notch2 humano y Notch3. En ciertas realizaciones, el agente específicamente fija Notch3 humano.

En un aspecto, el invento proporciona un anticuerpo 59R1 que comprende las secuencias de cadena pesada y cadena liviana proporcionada en SEQ ID NOs:16 y 18 (con o sin secuencia señal), respectivamente, o como se codificó por el ADN depositado con ATCC en Octubre 15, 2008, y número de designación asignado PTA-9547. El invento además proporciona polipéptidos o anticuerpos que comprenden la región variable de la cadena pesada (ej., SEQ ID NO:14) y/o la región variable de la cadena liviana (ej., SEQ ID NO:13) de tal anticuerpo 59R1. El invento además proporciona polipéptidos o anticuerpos que comprenden una o más (ej., 1, 2, o 3) CDRs de cadena pesada, y/o una o más CDRs de la cadena liviana del anticuerpo 59R1. En aún realizaciones adicionales, el invento proporciona anticuerpos que se fijan al mismo epitopo que el anticuerpo 59R1 o anticuerpos que compiten por fijación específica a Notch2 humano y/o Notch3 con el anticuerpo 59R1.

En otro aspecto, el invento proporciona un anticuerpo 59R5 que comprende las secuencias de cadena pesada y cadena liviana proporcionadas en SEQ ID NOs:49 y 18 (con o sin secuencia señal), respectivamente, o como se codificó por el ADN depositado con ATCC en Julio 6, 2009 y número de designación asignado PTA-10170. El invento además proporciona polipéptidos o anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de cadena pesada y/o la región variable de cadena liviana SEQ ID NO:50 y/o SEQ ID NO:13.

El invento además proporciona polipéptidos o anticuerpos que comprenden una o más (ej., 1, 2, o 3) CDRs de cadena pesada y/o una o más CDRs de cadena liviana del 59R5 anticuerpo. En aún realizaciones adicionales, el invento proporciona anticuerpos que se fijan al mismo epitopo que el anticuerpo 59R5 o anticuerpos que compiten por fijación específica a Notch2 humano y/o Notch3 con el anticuerpo 59R5.

En ciertas realizaciones adicionales, el invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a dos o mas (es decir, al menos dos o dos, tres, o cuatro) receptores Notch humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de los dos o mas receptores Notch humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de los dos o mas receptores Notch humanos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se fija a EGF10 de Notch1, Notch2, o Notch4, y/o a EGF9 de Notch3. En ciertas realizaciones, la región no fijadora de ligandos a la cual el anticuerpo se fija no es EGF4 o no comprende EGF4. En ciertas realizaciones, los dos o mas receptores Notch humanos comprenden Notch2 y/o Notch3. En ciertas realizaciones, los dos o más receptores Notch humanos comprenden Notch2 y Notch3. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un antagonista de los dos o más receptores Notch humanos.

El invento además proporciona un método para la modulación la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente que específicamente fija Notch2 humano y/o Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente es un antagonista.

El invento además proporciona un método de inhibir angiogenesis en un sujeto, que comprende el paso de administrar al sujeto un cantidad efectiva de un agente que específicamente fija Notch2 humano y/o Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente es un antagonista. En ciertas realizaciones, el antagonista es un antagonista de Notch2. En ciertas realizaciones, el antagonista es un antagonista de Notch3. En ciertas realizaciones, el antagonista es un antagonista de Notch2 y Notch3. En algunas realizaciones, el método de inhibir

angiogenesis comprende modulación de la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular. En algunas realizaciones, la angiogenesis es angiogénesis tumoral.

En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch es un antagonista de los receptores Notch humanos a los cuales específicamente se fija. En en algunas realizaciones alternativas, el agente de fijación Notch es un agonista de los receptores Notch humanos a los cuales específicamente se fija.

En ciertas realizaciones, el agente que específicamente se fija a uno o más receptores Notch y es un antagonista de uno o más receptores Notch inhibe al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100% de una o más actividades de receptores Notch fijados.

En ciertas realizaciones, el antagonista de uno o más receptores Notch humanos (ej., Notch2 y/o Notch3) tiene uno o más de los siguientes efectos: inhibir la fijación de ligandos a uno o más receptores Notch humanos, inhibir señalización inducida por ligandos por el uno o más receptores Notch; inhibir proliferación de células tumorales; reducir la tumorigenicidad de un tumor al reducir la frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor; inhibir crecimiento tumoral; aumentar superviviencia, disparar muerte célular de células tumorales; inhibir angiogenesis; o prevenir metástasis de células tumorales.

En ciertas realizaciones, el antagonista tiene uno o más de los siguientes efectos: interferencia con la expresión de un receptor Notch ; interferencia con activación de una ruta de transducción de señales del receptor Notch, por ejemplo, inhibiendo estericamente las interacciones entre el receptor Notch y uno o más de sus ligados, o fijación a un receptor Notch humano y disparar muerte celular o inhibir proliferación celular.

En ciertas realizaciones, antagonistas contra un receptor Notch , tales como Notch2 o Notch3, actuan extracelularmente para activar o inhibir la función del receptor Notch. En ciertas realizaciones, un antagonista es una pequeña molécula que se fija al dominio extracelular de un receptor Notch . En ciertas realizaciones, un antagonista de un receptor Notch es proteinaceo. En algunas realizaciones, los antagonistas proteinaceos de un receptor Notch son anticuerpos que específicamente se fijan a un epitopo extracélular de un receptor Notch . La fijación extracelular de un antagonista contra un receptor Notch puede

inhibir la señalización de una proteína del receptor Notch al inhibir activación intrínseca (ej., actividad de quinasa) de un receptor Notch y/o al inhibir estericamente la interacción, por ejemplo, de un receptor Notch con uno de sus ligados. Además, la fijación extracélular de un antagonista contra un receptor Notch puede regular de manera negativa la expresión de superficie célular de un receptor Notch tal como, por ejemplo, por internalización de un receptor Notch y/o disminución de trafico de superficie célular de un receptor Notch .

En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista (ej., anticuerpo) específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de al menos un receptor Notch humano, en donde la región no fijadora de ligandos comprende la repetición EGF10 (o el equivalente si se tratara de Notch3). En ciertas realizaciones, el agente o antagonista específicamente se fija a Notch2. En ciertas realizaciones, el agente o antagonista específicamente se fija a Notch3. En ciertas realizaciones, el agente o antagonista específicamente se fija a ambos Notch2 humano y Notch3 humano.

En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista (ej., anticuerpo) específicamente se fija a un dominio EGF10 de Notch2 humano. En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista no se fija a ninguna región del Notch2 humano fuera del dominio EGF10. En ciertas realizaciones alternativas, el agente de fijación Notch o antagonista que específicamente se fija a un dominio EGF10 de Notch2 humano, también además se fija a otra región de Notch2 humano. En otras palabras, en algunas realizaciones, el epitopo entero del agente o antagonista cae dentro de EGF10. En ciertas otras realizaciones, el epitopo del agente o antagonista que fija a Notch2 humano parcialmente se sobrepone con EGF10. En ciertas realizaciones, el agente o antagonista se fija a al menos parte de la secuencia HKGAL (SEQ ID NO:28) dentro de Notch2 humano EGF10. En ciertas realizaciones, el agente o antagonista también fija sus otros aminoácidos dentro de Notch2 humano EGF10 (ej., el epitopo entero de un anticuerpo anti-Notch2 no es necesariamente contenido completamente dentro de la secuencia HKGAL).

En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista adicional específicamente se fija a al menos un receptor Notch humano adicional (ej., Notch1, Notch3, o Notch4). En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista que fija a EGF10 de Notch2 humano además se fija a un dominio EGF10 de Notch1 humano,

un dominio EGF9 de Notch3 humano, y/o un dominio EGF10 de Notch4 humano. En ciertas realizaciones, el receptor Notch humano adicional es Notch3 humano.

En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista (ej., anticuerpo) se fija a un dominio EGF9 de Notch3 humano. Como se manifiesta de la homología entre las secuencias del dominio extracelular de Notch2 humano y Notch3 humano, EGF9 es el EGF que equivale a la estructura funcional de Notch2 EGF10 en Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista no se fija a ninguna región del Notch3 humano fuera de EGF9. En ciertas realizaciones, el agente o antagonista se fija a al menos parte de la secuencia HEDAI (SEQ ID NO:29) dentro del dominio Notch3 humano EGF9. HEDAI (SEQ ID NO:29) es la secuencia dentro del dominio Notch3 EGF9 que corresponde a la secuencia HKGAL (SEQ ID NO:28) dentro de Notch2 humano EGF10. En ciertas realizaciones, el agente o antagonista también fija sus otros aminoácidos dentro de Notch3 humano EGF9. En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista se fija a un dominio EGF10 de al menos un receptor Notch adicional humano (ej., Notch1, Notch2, y/o Notch4). En ciertas realizaciones, el receptor Notch adicional humano es Notch2 humano, tal como un agente o antagonista que se fija a un dominio Notch2 humano EGF10. En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista no se fija a ninguna región del Notch2 humano fuera de EGF10. En ciertas realizaciones, el agente o antagonista se fija a al menos parte de la secuencia HKGAL (SEQ ID NO:28) dentro de Notch2 humano EGF10. En algunas realizaciones, el agente o antagonista es un anticuerpo monoespecifico que fija a al menos parte de la secuencia HKGAL (SEQ ID NO:28) en Notch2 y también se fija a al menos parte de la secuencia HEDAI (SEQ ID NO:29) en Notch3.

En ciertas realizaciones alternativas , el agente de fijación Notch o antagonista se fija a una parte de la región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch1, Notch2, o Notch4 en una región diferente a EGF10 o un receptor Notch3 en una región diferente a EGF9. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agente o antagonista se fija al dominio LNR-HD de uno o más receptores Notch. En ciertas realizaciones, el agente o antagonista se fija a EGF1, EGF2, EGF3, EGF4, EGF5, EGF6, EGF7, EGF9, EGF10, EGF13, EGF14, EGF15, EGF16, EGF17, EGF18, EGF19, EGF20, EGF21, EGF22, EGF23, EGF24, EGF25, EGF26, EGF27, EGF28, EGF29, EGF30,

EGF31, EGF32, EGF33, EGF34, EGF35, y/o EGF36 de un dominio extracelular de uno o más receptores Notch.

En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista se fija a la región fijadora de ligados de un dominio extracelular de uno o más receptores Notch humanos. Así, en ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista puede fijarse a EGF11 y/o EGF12 de Notch 1, 2, o 4 (Rebay, 1991, *Cell* 67:687; Lei, 2003, *Dev.* 130:6411; Hambleton, 2004, *Structure* 12:2173) o EGF10 y/o EGF11 de Notch3 (Peters, 2004, *Experimental Cell Research*, 299:454-464).

En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch (ej., anticuerpo) específicamente se fija a dos o más receptores Notch humanos (ej., Notch1, Notch2, Notch3, y/o Notch4). En otras palabras, en ciertas realizaciones, el agente o anticuerpo se fija a al menos dos receptores Notch humanos (es decir, dos, tres, o cuatro receptores Notch humanos). Incluidos están los agentes y anticuerpos que específicamente se fijan a dos receptores de la familia Notch humanos (ej., Notch2 y Notch3, Notch1 y Notch2, Notch1 y Notch3, Notch1 y Notch4, Notch2 y Notch4, o Notch3 y Notch4). Agentes y anticuerpos que específicamente se fijan a tres miembros de familia de receptores Notch humanos también son contemplados (ej., agentes y anticuerpos que específicamente se fijan a Notch1, Notch2, y Notch3, Notch1, Notch2, y Notch4, o Notch2, Notch3, y Notch4), como son agentes y anticuerpos que específicamente se fijan a cuatro miembros de la familia de receptores Notch humanos (ej., agentes y anticuerpos que específicamente se fijan a Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4). En ciertas realizaciones, el agente o anticuerpo específicamente se fija a ambos Notch2 humano y Notch3. En ciertas realizaciones alternativas , el agente o anticuerpo específicamente se fija a ambos Notch1 humano y Notch2. En algunas realizaciones, el agente o anticuerpo específicamente se fija a ambos Notch1 humano y Notch3. En aún realizaciones adicionales, el agente o anticuerpo específicamente se fija a ambos Notch1 humano y Notch4. En ciertas realizaciones, el agente o anticuerpo es un antagonista de los dos o más receptores Notch humanos.

En ciertas realizaciones, el agente de fijación Notch o antagonista se fija a un receptor Notch (ej., Notch2 y/o Notch3) con una constante de disociación de aproximadamente 1 μM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, o aproximadamente 10 nM o menos. En

ciertas realizaciones, el agente o antagonista fija uno o más receptores Notch humanos, tales como Notch2 humano y/o Notch3 humano, con una K_D de 1 nM o menos. En algunas realizaciones, la fijación del agente Notch es un anticuerpo que se fija a Notch2 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menos. En algunas realizaciones, la fijación del agente Notch es un anticuerpo que se fija a Notch3 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menos. En ciertas realizaciones, la constante de disociación para el agente o antagonista con respecto a un receptor Notch particular es la constante de disociación determinada que utiliza una proteina de fusión Notch-Fc que comprende el dominio extracelular Notch y/o una porción del dominio extracelular que comprende EGF10 inmovilizado sobre un chip Biacore.

En ciertas realizaciones, el antagonista específicamente se fija a Notch3 humano e inhibe fijación de un ligando (ej., DLL4, JAG1, y/o JAG2) a Notch3 humano y/o inhibe señalización Notch3 humano. En ciertas realizaciones, el antagonista específicamente se fija a Notch2 humano e inhibe fijación de un ligando (ej., DLL4, JAG1, y/o JAG2) a Notch2 humano y/o inhibe señalización de Notch2 humano. En ciertas realizaciones, el antagonista inhibe señalización Notch2 inducida por DLL4. En ciertas realizaciones, el antagonista inhibe señalización Notch3 inducida por DLL4. En ciertas realizaciones, el antagonista inhibe señalización Notch2 inducida por JAG2. En ciertas realizaciones, el antagonista inhibe señalización Notch3 inducida por JAG2. En ciertas realizaciones, la señalización por Notch2 y/o Notch3 es reducida en aproximadamente 10%, en aproximadamente 25%, en aproximadamente 50%, en aproximadamente 75%, en aproximadamente 90%, o en aproximadamente 95%. En ciertas realizaciones, la fijación de uno o más ligandos a Notch2 y/o Notch3 es reducida en aproximadamente 10%, en aproximadamente 25%, en aproximadamente 50%, en aproximadamente 75%, en aproximadamente 90%, o en aproximadamente 95%.

En algunas realizaciones, los antagonistas contra un receptor Notch se fijan a un receptor Notch y tienen uno o más de los siguientes efectos: inhibir proliferación de células tumorales, disparar muerte célular directamente en células tumorales, o prevenir la metástasis de células tumorales. En ciertas realizaciones, antagonistas de un receptor Notch disparan muerte célular a traves de una toxina conjugada , agente quimioterapeutico, radioisotopo, u otro de tales agentes. Por ejemplo, un anticuerpo contra un receptor Notch es conjugado a una toxina que se activa en células tumorales que expresan el receptor

Notch por internalización de la proteina. En otras realizaciones, antagonistas de un receptor Notch median en la muerte célular de una célula que expresa el receptor Notch a traves de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). ADCC involucra lisis célular por efecto o células que reconocen la porción Fc de un anticuerpo. Muchos linfocitos, monocitos, macrofagos de tejidos, granulocitos y eosinofilos, por ejemplo, tienen receptores Fc y pueden mediar la citólisis (Dillman, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1497). En algunas realizaciones, un antagonista de un receptor Notch es un anticuerpo que dispara muerte célular de la celula que expresa un receptor Notch al activar citotoxidad dependiente de complemento (CDC). CDC involucra fijación de complemento sérico a la porción Fc de un anticuerpo y activación subsecuente de la cascada de proteinas de complemento, resultando en daño de la membrana celular y eventual muerte celular. Se sabe que la actividad biologica de anticuerpos esta determinada, en gran medida, por los dominios constantes o región Fc del anticuerpo molecular (Uananue y Benacerraf, Manual de Inmunologia, 2da Edición, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Anticuerpos de clases y subclases diferentes difieren en cuanto a esto, como lo hacen anticuerpos de las mismas subclases pero de diferentes especies. De los anticuerpos humanos, IgM es la clase de anticuerpos más eficiente para fijar complement, seguido por IgG1, IgG3, y IgG2 mientras IgG4 parece bastante deficiente para activar la cascada de complemento (Dillman, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1497; Jefferis, 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76). Según el presente invento, anticuerpos de esas clases son preparados teniendo la actividad biologica deseada.

La capacidad de cualquier anticuerpo particular contra un receptor Notch para mediar en lisis de la célula objetivo mediante activación de complemento y/o ADCC puede probarse. Las células de interés son cultivadas y rotuladas *in vitro*; el anticuerpo es agregado al cultivo célular en combinación con cualquiera, complemento sérico o células immunes las cuales pueden activarse mediante los complejos antígeno-anticuerpo. La citolisis de las células objetivo es detectada, por ejemplo, mediante la liberacion del rótulo a partir de las células lisadas. En realidad, los anticuerpos pueden clasificarse utilizando el propio suero del paciente como una fuente de complemento y/o células immune. El anticuerpo que es capaz de activar complemento o mediar ADCC en la prueba *in vitro* puede utilizarse luego terapéuticamente en ese paciente particular.

En ciertas realizaciones, el agente o antagonista fijador Notch es un anticuerpo que no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo no tiene actividad de toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o actividad de toxicidad no dependiente de complemento (CDC). En ciertas realizaciones, el anticuerpo no se fija a un receptor Fc y/o factores de complemento. En ciertas realizaciones, el anticuerpo no tiene función efectora.

En otras realizaciones, antagonistas de un receptor Notch pueden disparar muerte celular indirectamente al inhibir angiogenesis. La angiogenesis es el proceso por el cual nuevas células sanguineas se forman a partir de vasos pre-existentes y es un proceso fundamental requerido para el crecimiento normal, por ejemplo, durante desarrollo embriónico, curación de heridas, y en en respuesta a ovulación. El crecimiento tumoral sólido mayor que 1-2 mm^2 también requiere angiogenesis para proporcionar nutrientes y oxígeno sin los cuales las células tumorales mueren. Así, en ciertas realizaciones, un antagonista de un receptor Notch direcciona células vasculares que expresan el receptor Notch incluyendo, por ejemplo, células endoteliales, células de musculo liso o componentes de la matriz extracelular requerida para ensamble vascular. En ciertas realizaciones, un antagonista de un receptor Notch (ej., Notch2 y/o Notch3) direcciona pericitos y/o células de musculo liso vascular. En otras realizaciones, un antagonista de un receptor Notch inhibe señalización de factor de crecimiento requerida para reclutamiento de células vasculares, ensamble, mantenimiento o supervivencia. En ciertas realizaciones, el antagonista modula la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular.

En ciertas realizaciones los agentes fijadores Notch o antagonistas (ej., anticuerpos), bien sea solos o en combinación con un segundo agente terapéutico, son capaces de inhibir crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, los agentes fijadores Notch o antagonistas son capaces de inhibir crecimiento tumoral *in vivo* (ej., en un modelo murino de xenoinjerto y/o en un humano que tiene cáncer). En ciertas realizaciones, los agentes fijadores Notch o antagonistas son capaces de inhibir crecimiento tumoral en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 90% en un momento dado en un modelo de xenoinjerto. En ciertas realizaciones, los agentes fijadores Notch o antagonistas

previenen crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, los agentes fijadores Notch o antagonistas inhiben recurrencia tumoral.

En ciertas realizaciones, los agentes fijadores Notch son capaces de reducir la tumorigenicidad de un tumor. En ciertas realizaciones, el agente o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerígenas en un modelo animal, tal como un modelo de xenoinjerto murino. En ciertas realizaciones, el número o frecuencia de células madre cancerígenas en un tumor se reduce al menos aproximadamente dos-veces, aproximadamente tres-veces, aproximadamente cinco-veces, aproximadamente 10-veces, aproximadamente 50-veces, aproximadamente 100-veces, o aproximadamente 1000-veces (ej., en un modelo de xenoinjerto). En ciertas realizaciones, la reducción en la frecuencia de células madre cancerígenas es determinada por ensayo de dilución limitante que utiliza un modelo animal. Un ejemplo de un ensayo de dilución limitante utilizado para probar la eficacia de un anticuerpo anti-Notch es proporcionado en el Ejemplo 8, a continuación. Ejemplos y asesoramiento adicional con respecto al uso de ensayos de dilución limitante para determinar una reducción en el número o frecuencia de células madre cancerígenas en un tumor pueden encontrarse, ej., en Publicación Internacional No. WO 2008/042236, Publicación de Solicitud de Patente estadounidense Nos. 2008/0064049, y 2008/0178305, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

El presente invento proporciona una variedad de polipéptidos, incluyendo pero sin limitar a, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En ciertas realizaciones, el polipéptido es aislado. En ciertas realizaciones alternativas, el polipéptido es sutancialmente puro.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos del presente invento pueden ser polipéptidos recombinantes, polipétidos naturales, o polipéptidos sintéticos que comprenden la secuencia de SEQ ID NOs:2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, o 57 (con o sin las secuencias señal indicadas), así como también los polipéptidos que comprenden los polipéptidos codificados por los polinucleotidos de SEQ ID NOs: 1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59, o 60 (con o sin las secuencias señal indicadas).

El invento proporciona un polipéptido que comprende la cadena pesada y/o la cadena liviana de 59R1 proporcionada en SEQ ID NO:16 y/o SEQ ID NO:18, respectivamente. En ciertas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas

realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch2 y/o Notch3. En algunas realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch2 y Notch3.

El invento proporciona un polipéptido que comprende la cadena pesada y/o la cadena liviana de 59R5 proporcionada en SEQ ID NO:49 y/o SEQ ID NO:18, respectivamente. En ciertas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch2 y/o Notch3. En algunas realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch2 y Notch3.

El invento además proporciona un polipéptido que comprende SEQ ID NO:13 y/o SEQ ID NO:14. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:14. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:50. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:50. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:52. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:53. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:54. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:55. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEQ ID NO:56. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de cadena liviana variable que comprende SEQ ID NO:13 y/o una secuencia de cadena pesada

variable que comprende SEQ ID NO:57. En ciertas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch2 y/o Notch3. En algunas realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch2 y Notch3. En algunas realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch2 humano. En algunas realizaciones, el polipéptido específicamente fija Notch3 humano.

Se reconocerá en el estado de la técnica que algunas secuencias de aminoácidos del invento pueden variarse sin efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Si tales diferencias en secuencia son contempladas, se debe recordar que existirán áreas críticas sobre la proteína que determinan actividad. Así, el invento además incluye variaciones de los polipéptidos que muestran actvidad sustancial. Tales mutantes incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones, y sustituciones de tipo. El asesoramiento con respecto al cual los cambios aminoácidos tienen probabilidad de ser fenotípicamente silenciosos puede encontrarse en Bowie, Decifrando el Mensaje de Secuencias Proteicas: Tolerancia a Sustituciones Aminoácidas, 1990, *Science* 247:1306-1310.

Así, los fragmentos, derivados, o análogos de los polipéptidos del invento pueden ser: (i) uno en el cual uno o más de los residuos aminoácidos son sustituidos con un residuo aminoácido conservado o no conservado (a menudo un residuo aminoácido conservado) y tales residuos aminoácidos sustituidos pueden o pueden no ser codificados por el código genético; o (ii) uno en el cual uno o más de los residuos aminoácidos incluyen un grupo sustituyente; o (iii) uno en el cual el polipéptido maduro se funde con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido (por ejemplo, glicol de polietileno); o (iv) uno en el cual los aminoácidos adicionles se fusionan al polipéptido maduro, tales como una secuencia líder o secretoria o una secuencia la cual es empleada para purificación del polipéptido maduro o una secuencia proprotéica. Se considera que tales fragmentos, derivados, y análogos se encuentran dentro del alcance de las enseñanzas en la presente.

De interés particular son las sutituciones de un aminoácido cargado con otro aminoácido cargado y con aminoácido neutral o cargado negativamente. El último resulta en proteínas con carga positiva reducida. La carga positiva reducida sobre una proteína puede llevar a la reducción en agregación proteica y la prevención de agregación es

altamente deseable. La agregación de proteínas no puede resultar unicamente en una pérdida de actividad sino también puede ser problemática al preparar formulaciones farmacéuticas, debido a que los agregados pueden ser inmunogenicos. (Pinckard, 1967, *Clin. Exp. Immunol.* 2:331-340; Robbins, 1987, *Diabetes* 36:838-845; Cleland, 1993, *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10:307-377).

Como se indicó, los cambios aminoácidos son típicamente de una naturaleza menor, tales como sustituciones aminoácidas conservadoras que no afectan significativamente el doblamiento o actividad de la proteína (ver Tabla 1.)

Tabla 1. Sustituciones Aminoácidas Conservativas

Aminoácido Original	Sustituciones Conservativas de Ejemplo
Alanina	Valina, Isoleucina, Leucina, Glicina, Serina
Arginina	Lisina, Histidina, Glutamina, Asparagina
Asparagina	Glutamina, Histidina, Lisina, Arginina
Ácido Aspártico	Ácido Glutamínico, Asparagina
Cisteina	Serina, Alanina, Metionina
Glutamina	Asparagina
Ácido Glutamínico	Ácido Aspártico, Glutamina
Glicina	Prolina, Alanina
Histidina	Asparagina, Glutamina, Lisina, Arginina
Isoleucina	Leucina, Valina, Metionina, Alanina, Fenilalanina, Norleucina
Leucina	Norleucina, Isoleucina, Valina, Metionina, Alanina, Fenilalanina
Lisina	Arginina, Glutamina, Asparagina, Histidina
Metionina	Leucina, Fenilalanina, Isoleucina, Valina, Cisteina
Fenilalanina	Leucina, Valina, Isoleucina, Alanina, Tirosina

Prolina	Alanina, Glicina
Serina	Treonina
Treonina	Serina
Triptófano	Tirosina, Fenilalanina
Tirosina	Triptófano, Fenilalanina, Treonina, Serina
Valina	Isoleucina, Metionina, Leucina, Fenilalanina, Alanina, Norleucina

Naturalmente, el número de sustituciones aminoácidas hechas depende de muchos factores, incluyendo aquellos descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, el número de sustituciones para cualquier polipéptido dado no será más de 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, o 3.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos y polinucleotidos del presente invento se proporcionan en una forma aislada, y a veces se purifican hasta homogeneidad.

Los polipéptidos del presente invento incluyen los polipéptidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, o 57 así como también polipéptidos que tienen al menos 90% de similitud (en ciertos momentos al menos 90% de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, o 57 y al menos 95% de similitud (en ciertos momentos al menos 95% de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, o 57 y en aún otras realizaciones, polipéptidos que tienen al menos 96%, 97%, 98%, o 99% de similitud (en ciertos momentos 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia) con los polipéptidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, o 57. Como se conoce en el estado de la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia aminoácida y sus sustitutos aminoácidos conservados de un polipéptido a la secuencia de un segundo polipéptido.

Fragmentos o porciones de los polipéptidos del presente invento pueden emplearse para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente para síntesis peptídica; por lo tanto, los fragmentos pueden emplearse como intermendios para producir los polipéptidos de longitud total. Fragmentos o porciones de los polinucleótidos del presente invento puede utilizarse para sintetizar polinucleotidos de longitud total del presente invento.

En ciertas realizaciones, un fragmento de las proteínas de este invento es una porción o toda una proteína la cual es capaz de fijarse a una proteína del receptor Notch. Este fragmento tiene una afinidad alta para un receptor Notch o un ligando de un receptor Notch. Ciertos fragmentos de proteínas de fusión son fragmentos proteicos que comprenden al menos parte del domino de fijación Notch del agente polipéptido o antagonista fusionado a al menos parte de una región constante de una immunoglobulina. La afinidad típicamente está en el rango entre 10^{-11} y 10^{-12} M aproximadamente, aunque la afinidad puede variar considerablemente con fragmentos de diferentes tamaños, se encuentra en el rango entre 10^{-7} y 10^{-13} M. En algunas realizaciones, el fragmento tiene aproximadamente 10-110 aminoácidos de longitud y comprende el domino de fijación Notch del agente polipéptido o antagonista fijado a al menos parte de una región constante de una immunoglobulina.

Los polipéptidos y análogos pueden además modificarse para contener fracciones químicas adicionales que normalmente no son parte de la proteína. Aquellas fracciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la vida media biológica o la absorción de la proteína. Las fracciones también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario indeseable de las proteínas y similares. Una reseña general para aquellas fracciones puede encontrarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

Los polipéptidos aislados descritos en la presente pueden producirse mediante cualquier método apropiado conocido en el estado de la técnica. Tales métodos abarcan desde métodos de síntesis proteica directa, hasta construcción de una secuencia de ADN que codifique secuencias polipeptidicas aisladas y expresión de estas secuencias en un huésped transformado apropiado.

En algunas realizaciones de un método recombinante, una secuencia de ADN es construida aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia puede mutagenizarse mediante mutagenisis específica a sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Ver, ej. Zoeller, 1984, *Proc. Nat Acad. Sci. USA* 81:5662-5066 y U.S. Pat. No. 4,588,585. Otro método de contrucción de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés puede ser mediante síntesis química utilizando un sintetizador oligonucleótico. Tales oligonucleótidos pueden diseñarse basados en la secuencia aminoácida del polipéptido deseado y seleccionando esos codones que son favorecidos en la célula huésped en la cual el polipéptido recombinante de interés se producirá.

Métodos estándares pueden aplicarse para sintetizar una secuencia polinucleótica aislada que codifique un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, una secuencia aminoácida completa puede utilizarse para constuir un gen transladado de vuelta. Además, un oligómero de ADN que contiene una secuencia nucleotica que codifica el polipéptido aislado particular puede sintetizarse. Por ejemplo, varios oligonucletidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado pueden sintetizarse y luego ligarse. Los oligonucleótidos individuales típicamente contienen 5' o 3' voladizos para ensamble complementario.

Una vez ensambladas (mediante síntesis, mutagenesis dirigida a sitio, u otro método), las secuencias de ADN mutante que codifican un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y operativemente se enlazarán a una secuencia de control de expresión apropriada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamble apropiado puede confirmarse mediante secuenciamiento nucleotico, mapeo de restricción, y expresión de un polipéptido biologicamente activo en un huésped apropiado. Como es bien conocido en el estado de la técnica, para obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen es enlazado operativamente a secuencias de control de expresión transcripcionales y translacionales que son funcionales en el huésped de expresión elegido.

Los vectores de expresión recombinantes pueden utilizarse para amplificar y expresar ADN que codifica polipéptidos. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN derivados de cADN o

sintéticos que condifican un receptor de fusión Notch o un bioequivalente análogo operativamente enlazado a elementos reguladores transcripcionales o transaccionales apropiados derivados a partir de genes mamíferos, microbianos, virales o de insecto. Una unidad transcripcional generalmente comprende un ensamble de (1) un elemento genético o elementos que tienen un papel regulador en expresión genética, por ejemplo, promotores o mejoradores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificadora que se transcribe a mARN y se traduce en proteína, y (3) secuencias de iniciación y terminación de transcripción y traducción, como se describe en detalle a continuación. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar transcripción. Un origen de replicación que usualmente confiere la capacidad de replicar en un huésped y un gen de selección para facilitar reconocimiento de transformantes puede incorporarse adicionalmente. Las regiones de ADN son enlazadas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretorio) es operativamente enlazado al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor es operativamente enlazado a una secuencia codificadora si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de fijación de ribosoma es operativamente enlazado a una secuencia codificadora si es posicionado para permitir traducción. Generalmente, "enlazado operativamente" significa adyacente y, en el caso de los líderes secretorios, significa adyacente y marco de lectura. Elementos estructurales diseñados para el uso en sistemas de expresión de levaduras incluyen una secuencia líder que permite secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, donde la proteína recombinante es expresada sin una secuencia líder o de transporte, se puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Este residuo puede opcionalmente subsiguientemente escindirse desde la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de secuencia de control de expresión y vector de expresión dependerá de la elección de huésped. Una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión pueden emplearse. Vectores de expresión útiles para huéspedes eucarióticos, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus de papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como

plásmidos de *Esherichia coli*, incluyendo pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, y plásmidos de rango hospedero más amplio, tales como M13 y fagos de ADN de hebra sencilla filamentosa.

Células huésped apropiadas para expresión de un polipéptido incluyen células procarióticas, de levadura, de insecto o eucarióticas superiores bajo el control de promotores apropiados. Procariontes incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o *Bacilli*. Células eucarióticas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe en la presente. Sistemas de traducción libres de células también pueden emplearse. Vectores de clonado y expresión apropiados para utilizar con huéspedes celulares bacterianos, micóticos, de levadura, y mamíferos son descritos por Pouwels (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual,* Elsevier, N.Y., 1985), la divulgación relevante del cual se incorpora en la presente como referencia.

Varios sistemas de cultivo celular mamífero o de insecto también son empleados ventajosamente para expresar la proteína recombinante. La expresión de la proteína recombinante en células mamíferas puede transformarse debido a que tales proteínas generalmente se doblan de manera correcta, apropiadamente se modifican y son completamente funcionales. Ejemplos de líneas de células huésped mamíferas apropiadas incluyen la línea COS-7 de células renales de mono, descritas por Gluzman 1981, *Cell* 23:175, y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado incluyendo, por ejemplo, células L, C127, 3T3, Ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares HeLa y BHK. Vectores expresión mamífera pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y mejorador apropiado enlazado al gen para expresarse, y otras secuencias 5' o 3' no transcritas colindantes, y secuencias 5' o 3' no traducidas, tales como sitios de fijación de ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de unión, y secuencias de terminación transcripcional. Sistemas de baculovirus para producción de proteínas heterólogas en células de insecto son citados por Luckow y Summers, 1988, *Bio/Technology* 6:47.

Las proteínas producidas por un huésped transformado pueden purificarse según cualquier método apropiado. Tales métodos estándares incluyen cromatografía (ej., cromatografía de intercambio iónico, afinidad y en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para purificación de

proteínas. Etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de fijación de maltosa, recuencia revestida por influenza y glutationa-S-transferasa pueden fijarse a la proteína para permitir purificación fácil por pasaje sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente utilizando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos x.

Por ejemplo, sobrenadantes a partir de sistemas que segregan la proteína recombinante en un medio de cultivo pueden concentrarse primero utilizando un filtro de concentración proteico comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Milipore. Después del paso de concentración, el concentrado puede aplicarse a la matriz de purificación apropiada. Alternativamente, un resina de intercambio aniónico puede emplearse, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos colgantes de dietilaminoetilo (DEAE). La matriz puede ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en purificación de proteínas. Alternativamente, un paso de intercambio catiónico puede emplearse. Intercambiadores catiónicos apropiados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos de sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, uno o más pasos de cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa (RP-HPLC por su sigla en inglés) empleando medios RP-HPLC hidrofóbicos, ej., gel de sílice que tiene metilo colgante u otros grupos alifáticos, pueden emplearse para purificar adicionalmente una composición proteica-Fc de célula madre cancerígena. Algunos o todos los pasos anteriores de purificación, en varias combinaciones, pueden emplearse también para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano es aislada usualmente mediante extracción inicial a partir de pellets celulares, seguida por uno o más pasos de concentración, salting-out, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) puede emplearse para el paso final de purificación. Células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden alterarse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclización licuado, sonificación, alteración mecánica, o uso de agentes de lisado celular.

En ciertas realizaciones, el agente fijador Notch o antagonista comprende un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es aislado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es sustancialmente puro.

El presente invento proporciona anticuerpos que compiten por la fijación específica a Notch2 humano y/o Notch3 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:14 y una región variable de cadena liviana que comprende SEQ ID NO:13. El presente invento también proporciona anticuerpos que compiten por la fijación específica a Notch2 humano y/o Notch3 con un anticuerpo que comprende, consiste, o consta esencialmente de un anticuerpo 59R1 IgG2 que comprende la cadena pesada y cadena liviana de SEQ ID NOs:16 y 18 (con o sin secuencia señal), respectivamente, o como se codificó por el ADN depositado con el ATCC en Octubre, 15, 2008, y número de designación asignado PTA-9547.

El invento además proporciona anticuerpos que específicamente se fijan a uno o más receptores Notch, que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis CDRs de SEQ ID NOs:5-10, 22-27, 30 o 51 con hasta cuatro (es decir,, 0, 1, 2, 3, o 4) sustituciones aminoácidas conservadoras (ver, ej., Tabla 1) por CDR. El invento también proporciona anticuerpos que específicamente se fijan a uno o más receptores Notch, que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis CDRs de 59R1 (es decir, SEQ ID NOs:5-10), con hasta cuatro sustituciones aminoácidas conservadoras por CDR. Así, el invento proporciona anticuerpos que específicamente se fijan a uno o más receptores Notch humanos que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDRs de 59R1. En ciertas realizaciones, los anticuerpos comprenden la cadena pesada CDR3 de 59R1, con hasta cuatro sustituciones aminoácidas conservadoras, y/o la cadena liviana CDR3 de 59R1, con hasta cuatro sustituciones aminoácidas conservadoras. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GIFFAI (SEQ ID NO:7), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas

conservadoras; y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras.

El invento también proporciona anticuerpos que específicamente se fijan a uno o más receptores Notch, que comprenden ona, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis CDRs de 59R5 (es decir,, SEQ ID NOs: 5, 6, 8-10, 51), con hasta cuatro sustituciones aminoácidas conservadoras por CDR. En ciertas realizaciones, los anticuerpos comprenden la cadena pesada CDR3 de 59R5, con hasta cuatro sustituciones aminoácidas conservadoras, y/o la cadena liviana CDR3 de 59R5, con hasta cuatro sustituciones aminoácidas conservadoras. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:51), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras. En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:51).

También se proporciona un anticuerpo que específicamente se fija un Notch2 y/o Notch3 humanos, en donde el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende (G/I)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30). En ciertas realizaciones, la cadena pesada CDR3 es seleccionada desde el grupo consta de SIFYPT (SEQ ID NO:22),

SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26), y SSFFAN (SEQ ID NO:27). En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende GIFFAI (SEQ ID NO:7). En ciertas realizaciones, las CDR(s) de cadena pesada están contenidas dentro de una región variable de un anticuerpo cadena pesada. En ciertas realizaciones, el anticuerpo además comprende una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). En ciertas realizaciones, las CDR(s) de cadena liviana están contenidas dentro de una región variable de un anticuerpo de cadena liviana. En ciertas realizaciones, la CDR(s) de cadena pesada y/o las CDR(s) de cadena liviana han sido modificadas con 1, 2, 3, o 4 sustituciones aminoácidas conservadoras. En ciertas realizaciones, cada CDR(s) han sido modificada por no más de 1-2 sustituciones aminoácidas conservadoras.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a Notch2 humano y/o Notch3 humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y una CDR3 de cadena pesada que comprende GIFFAI (SEQ ID NO:7); y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las CDRs tanto de cadena pesada como liviana indicadas.

En algunas realizaciones, el invento proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a Notch2 humano y/o Notch3 humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:51); y/o (b) una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y una CDR3 de cadena liviana que comprende

QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende CDRs tanto de cadena pesada como liviana indicadas.

El invento además proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a Notch2 humano y/o Notch3, en donde el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y/o una CDR3 de cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

El invento también proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a Notch2 humano y/o Notch3 humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:20; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:19. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente 95% identidad de secuencia con SEQ ID NO:14; y/o (b) una región variable de cadena liviana que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia to SEQ ID NO:13. En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende: (a) un polipéptido (ej., una región variable de cadena pesada) que comprende SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:20; y/o (b) un polipéptido (ej., una región variable de cadena liviana) que comprende SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:19.

El invento también proporciona un anticuerpo que específicamente se fija a Notch2 humano y/o Notch3, en donde el anticuerpo comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:50; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:13. Por consiguiente, en ciertas

realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:50; y/o (b) una región variable de cadena liviana que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:13. En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende: (a) un polipéptido (ej., una región variable de cadena pesada) que comprende SEQ ID NO:50; y/o (b) un polipéptido (ej., una región variable de cadena liviana) que comprende SEQ ID NO:13.

En ciertas realizaciones, los antagonistas son anticuerpos que pueden mediar citotoxicidad dependiente de complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo para eliminar tumores que expresan un antígeno objetivo. En ciertas realizaciones alternativas, los anticuerpos son directamente conjugados a toxinas o radioisotopos para mediar la elminación tumoral celular. Además, supervivencia tumoral depende de neo-vascularización, y en ciertas realizaciones, los anticuerpos tienen un efecto anti-angionénico.

El presente invento proporciona anticuerpos aislados contra un receptor Notch tal como Notch2 humano y/o Notch3 humano. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, puede ser cualquier anticuerpo monoclonal o polyclonal que específicamente reconoce el receptor Notch descrito. En algunas realizaciones, el presente invento proporciona anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, que específicamente se fijan a un receptor Notch descrito en la presente. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, anticuerpos quiméricos o humanizados que específicamente se fijan al dominio extracelular de un receptor Notch descrito en la presente. En otras realizaciones, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos humanos que específicamente se fijan al dominio extracelular de un receptor Notch descrito en la presente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos IgG1 o IgG2.

Los anticuerpos contra un receptor Notch encuentran uso en los métodos experimentales, diagnósticos y terapéuticos descritos en la presente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos del presente invento se utilizan para detectar la expresión de un receptor Notch en muestran biológicas tales como, por ejemplo, una biopsia tisular de paciente, efusión pleural, o muestra de sangre. Las biopsias tisulares pueden ser

seccionadas y la proteína detectada utilizando, por ejemplo, inmunofluorescencia o immunohistoquímica. Alternativamente, las células individuales a partir de una muestra son aisladas, y la expresión de proteína detectada sobre células fijas o vivas mediante analisis FACS. Además, los anticuerpos pueden utilizarse sobre arreglos de proteínas para detectar expresión de un receptor Notch, por ejemplo, sobre células tumorales, en lisados celulares, o en otras muestras de proteínas. En otras realizaciones, los anticuerpos del presente invento se utilizan para inhibir el crecimiento de células tumorales poniendo en contacto las células tumorales con los anticuerpos bien sea en ensayos con base celular *in vitro* o modelos animales *in vivo*. En aún otras realizaciones, los anticuerpos se utilizan para tratar cáncer en un paciente humano al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo contra un receptor Notch.

Los anticuerpos policlonales pueden prepararse mediante cualquier método conocido, los anticuerpos policlonales son producidos al inmunizar un animal (ej. a conejo, rata, ratón, asno, cabra, etc.) mediante múltiple inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (un fragmento peptídico purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc.) opcionalmente conjugado a la hemocianina extraída del molusco lapa californiana (KLH), albúmina de suero, etc. diluida en solución salina esteril y combinada con un adyuvante (ej. Adyuvantge Completo o Incompleto de Freund) para formar una emulsión estable. Luego el anticuerpo policlonal es recuperado a partir de sangre, ascitos y similares, de un animal así inmunizado. La sangre recolectada es coagulada, y el suero decantado, clarificado por centrifugación, y probado para titulo de anticuerpo. Los anticuerpos policlonales pueden purificarse a partir de suero o ascitos según métodos estándares en el estado de la técnica incluyendo cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, dialisis, etc.

Anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256:495. Utilizando el método del hidridoma, un ratón, hamster, u otro animal huésped apropiado, es inmunizado como se describe anteriormente para causar la producción mediante linfocitos de anticuerpos que específicamente se fijarán a un antígeno inmunizador. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después de inmunización, los linfocitos son aislados y fusionados con una línea celular de mieloma apropiada utilizando, por ejemplo,

glicol de polietileno, para formar células de hibridoma que luego pueden seleccionarse a partir de linfocitos sin fusionar y células de mieloma. Hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido como se determine mediante inmunoprecipitación, inmunoblot, o mediante un ensayo de fijación *in vivo* tales como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) luego pueden propagarse bien sea por cultivo *in vitro* utilizando métodos estándares (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academásic Press, 1986) o *in vivo* como ascitos tumorales en un animal. Luego los anticuerpos monoclonales pueden purificarse desde el medio de cultivo o ascites fluido como se describió para anticuerpos policlonales anteriores.

Alternativamente los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse utilizando métodos de ADN recombinante como se describe en la Patente estadounidense No. 4,816,567. Los polinucleotidos que codifican un anticuerpo monoclonal son aislados a partir de células B maduras o células de hibridoma, tal como mediante RT-PCR utilizando cebadores oligonucleotidos que específicamente amplifican los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo, y su secuencia se determina utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleotidos aislados que codifican las cadenas pesadas y livianas luego son clonados en vectores de expresión apropiados, los cuales cuando son transfectados a células hospederas tales como células de E. coli, células COS símicas, células de ovario de hamster Chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera no producen la proteína inmunoglobulina, expresan anticuerpos monoclonales en las células hospederas. También, anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de la especie deseada pueden aislarse a partir de bibliotecas de presentación de fagos, ej., como se describe en la presente.

Los polinucleotidos que codifican un anticuerpo monoclonal pueden modificarse adicionalmente en un número de formas diferentes utilizando tecnología de ADN recombinante para genrar anticuerpos alternativos. En algunas realizaciones, los dominios constantes de las cadenas livianas y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón pueden substituirse 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) por un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En otras realizaciones, las regiones constantes son

truncadas o retiradas para generar el fragmento deseado de anticuerpo de un anticuerpo monoclonal. Además, la mutagenesis dirigida a sitio o de alta densidad de la región variable pueden utilizarse para optimizar especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

Más generalmente, anticuerpos modificados útiles en el presente invento pueden obtenerse o derivarse desde cualquier anticuerpo. Además, el anticuerpo precursor, o fragmento del mismo, utilizado para generar los anticuerpos divulgados modificados puede ser murino, humano, quimérico, humanizado, primatizado. En otras realizaciones los anticuerpos modificados del presente invento pueden comprender constructos de anticuerpo de cadena sencilla (tales como aquel divulgado en Patente estadounidense No. 5,892,019, el cual se incorpora en la presente como referencia) con dominios constantes alterados como se describe en la presente. Consecuentemente, cualquiera de estos tipos de anticuerpos modificados según las enseñanzas en la presente son compatibles con este invento.

Según el presente invento, pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos a un polipéptido del invento (ver Patente estadounidense No. 4,946,778). Además, pueden adapatarse métodos para la construcción de bibliotecas de expresión Fab (Huse, 1989, *Science* 246:1275-1281) para permitir identificación rápida y efectiva de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para Notch, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos a un polipéptido del invento pueden producirse mediante técnicas en el estado de la técnica incluyendo, pero sin limitar a: (a) un fragmento $F(ab')_2$ producido mediante digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado al reducir los enlaces de disulfuro de un fragment $F(ab')_2$, (c) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaina y un agente reductor, y (d) Fragmentos Fv.

Los anticuerpos biespecíficos también están dentro del alcance del invento. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonal, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de fijación para al menos dos antígenos diferentes (o, en ciertas realizaciones, dos epitopos diferentes sobre el mismo antígeno). En el presente caso, una de las especificidades de fijación es para un polipéptido antigenóico del invento (Notch, o un fragmento del mismo), mientras el segundo blanco de fijación es

cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína de superficie celular, o receptor o subunidad de receptor. Se proporcionan anticuerpos biespecíficos que comprenden un sitio fijador de antígenos que específicamente se fijan a un receptor Notch humano (ej., Notch2) y además comprenden un segundo sitio fijador de antígenos diferente que específicamente se fijan a un segundo receptor Notch humano (ej., Notch3).

Métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el estado de la técnica. Tradicionalmente la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares cadena pesada/cadena liviana de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, 1983, *Nature* 305:537-539). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta usualmente es realizada por cromatografía de afinidad.

Alternativamente, en ciertas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente pueden ser monoespecíficos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cada uno del uno o más sitios fijador de antígenos que un anticuerpo contiene es capaz de fijación (o fija) el mismo uno o más receptores Notch humanos (ej., Notch2, Notch3, o epitopos homólogos sobre ambos Notch2 y Notch3). En ciertas realizaciones, un sitio fijador de antígenos de un anticuerpo monoespecífico descrito en la presente es capable de fijación (o fija) ambas la repetición EGF 9 de Notch3 humano y la repetición EGF 10 de Notch2.

Dominios variables de anticuerpos con las especificidades de fijación deseadas pueden fusionarse a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. La fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. La primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario fijación de cadena liviana puede estar presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena liviana de inmunoglobulina, son insertados en vectores de expression separados, y son co-transfectados a un organismo huésped apropiado. Detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos pueden encontrarse Suresh, 1986, *Methods in Enzymology* 121:210.

Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos. Técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos han sido descritas en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse utilizando unión química. Además, Brennan, 1985, *Science* 229:81 describe un procedimiento en donde anticuerpos intactos son escindidos de manera proteolítica para generar fragmentos F(ab')2 .

Adicionalmente, los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente a partir de E. coli y acoplarse quimicamente para formar anticuerpos biespecíficos (Shalaby, 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225). Estos métodos pueden utilizarse en la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico $F(ab')_2$.

También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos (Tutt, 1991, *J. Immunol.* 147:60).

Anticuerpos biespecíficos de ejempo pueden fijarse a dos epitopos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido del invento. Alternativamente, un brazo anti-antigenóico de una molécula de inmunoglobulina puede combinarse con un brazo which se fija a una molécula disparadora sobre un leucocito tal como una molécula receptora de células T (ej. CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG para enfocar mecanismo de defensa celular a la célula que expresa el antígeno particular. También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen brazo fijador de antígenos y un brazo que fija un agente citotóxico o un quelante radionuclido, tales como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA.

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance del presente invento. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para dirigir células inmunes a células indeseadas (Patente estadounidense No. 4,676,980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* utilizando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que involucran agentes eslabonadores. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace de tioéter. Ejemplos de reactivos apropiados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

Para los propósitos del presente invento, se debe apreciar queanticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que se encarge de la asociación del anticuerpo con los polipéptidos Notch. En cuanto a esto, la región variable puede comprender o derivarse a partir de cualquier tipo de mamífero que que puede ser inducido a elevar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado del tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, primate (ej., monos cinomolgos, macacos, etc.) o lupino. En algunas realizaciones ambas las regiones variables y constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras realizaciones las regiones variables de anticuerpos compatibles (usualmente derivadas de una fuente no humana) pueden ser modificadas o específicamente ajustadas para mejorar las propiedades de fijación o reducir la inmunogenicidad de la molécula. Respecto a esto, las regiones variables utiles en el presente invento pueden ser humanizadas o de otra manera alteradas a través de la inclusión de secuencias aminoácidas importadas.

En algunas realizaciones del presente invento el anticuerpo monoclonal contra un receptor Notch es un anticuerpo humanizado. Anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias mínimas desde anticuerpos no humanos (ej., murinos) dentro de la regiones variables. Tales anticuerpos se utilizan terapéuticamente para reducir antigenicidad y respuestas HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando se administrant a un sujeto humano. En la practica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos con secuecias mínimas a humanas. Un anticuerpo humano es un anticuerpo producido por un human o un anticuerpo que tiene un secuencia aminoácida que corresponde a un anticuerpo producido por un humano.

Los anticuerpos humanizados pueden producirse utilizando varias técnicas conocidas en el estado de la técnica. Un anticuerpo puede ser humanizado sustituyendo la CDR de un anticuerpo humano con aquella de un anticuerpo no humano (ej., ratón, rata, conejo, hamster, etc.) que tenga la especificidad, afinidad, y/o capacidad deseadas del anticuerpo (Jones, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann, 1988, *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, 1988, *Science* 239:1534-1536). El anticuerpo humanizado puede además modificarse mediante la sustitución de residuos adicionales bien seaq en la región de marco

Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar especificidad, afinidad, y/o capacidad del anticuerpo.

Como una alternative a humanization, pueden generarse anticuerpos humanos. Los anticuerpo humanos pueden prepararse utilizando varias técnicas conocidas en el estado de la técnica, incluyendo a partir de animales transgénicos, bibliotecas de fagos, y células B humanas actividas *in vitro*.

Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (ej., ratones) que contengan sitios de inmunoglobulina humana los cuales son capaces, ante inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homóciga a region que une gen de cadena pesada de en ratones quimericos y de línea germinal resulta en completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. Transferencia del arreglo de genes de inmunoglobulina en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpo humanos ante reto de antígenos. Ver, ej., Jakobovits, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits, 1993, *Nature* 362:255-258; Bruggemann, 1993, *Year en Immuno.* 7:33; Patente estadounidense Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669; 5,545,807; 5,545,807; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016; y WO 97/17852.

Alternativamente, la tecnología de presentación de fagos puede utilizarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina desde donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes de domonio variable de anticuerpos son clonados en marco a cualquiera un gen de protein principal o menor de revestimiento de un bacteriofago filamentoso, tal como M13 o fd, y presentados como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula fago. Puesto que la particular filamentosa contiene una copia de ADN de hebra sencilla del genoma fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe estas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación de fagos puede realizarse en una variedad de formatos. Varias fuentes de segmentos de genes V pueden utilizarse para la presentación de fagos. Un arreglo diverso de anticuerpos anti-oxazolona han sido aislados a partir de una biblioteca combinatorial aleatoria pequeña de genes V derivados desde los bazos de ratones

inmunizados. Un repertorio de genes V desde donantes humanos no inmunizados puede construirse y se pueden aislar anticuerpos a un arreglo diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos). Métodos de seleccionar anticuerpos humanos desde una biblioteca de fagos, donde la blblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (Vaughan, 1996, *Nature Biotechnology* 14:309-314; Sheets, 1998, *PNAS* 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; McCafferty, 1990, *Nature* 348:552-554; Clackson, 1991, *Nature* 352:624-628; y Marks, 1991, *J. Mol. Biol.,* 222:581-597). Técnicas para la generación y uso de blbliotecas de fagos de anticuerpos también se describen en las Patentes estadounidenses No. 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; y 7,264,963; y Rothe, 2008, *J. Mol. Bio.* 376:1182-1200 (cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en en su totalidad). Estrategias de maduración de afinidad, tales como entremezclado de cadenas (Marks, 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, incorporado como referencia en en su totalidad), son conocidas en el estado de la técnica y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

Los anticuerpo humanos también se pueden preparar directamente utilizando varias técnicas conocidas en el estado de la técnica. Linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados a partir de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo pueden ser generados. (Ver, por ejemplo, Cole, 1985, *Monoclonal Anticuerpos and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77; Boemer, 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; Patentes estadounidenses No. 5,750,373; 5,567,610; y 5,229,275).

Se apreciará que injertar los dominios variables no humanos enteros sobre regiones constantes humanas producirá anticuerpos quiméricos "clásicos". En el contexto de la presente solicitud el término "anticuerpos quiméricos" se referirá a cualquier anticuerpo en donde el sitio o región inmunoreactiva región es obtenido o derivado desde una primera especie y la región constante (la cual puede ser intacta, parcial o modificada según este invento) es obtenida a partir de una segunda especie. En algunas realizaciones, la región o sitio fijador de antígenos sera desde una fuente no humana (ej., ratón) y la región constante es humana. Mientras la especificidad inmunogénica de la región variable no es

generalmente afectada por su fuente, es menos probable que una región constante humana produzca una respuesta inmune desde un sujeto humano en comparación con la región constante desde una fuente no humana.

Los dominios variables en ambas la cadena pesada y la cadena liviana son alterados mediante reemplazo al menos parcial de una o más CDRs y, si es necesario, por reemplazo parcial de regiones de marco y modificación de secuencias. Aunque las CDRs pueden derivarse desde un anticuerpo de la misma clase o aún subclase como el anticuerpo desde el cual regiones de marco son derivadas, se contempla que las CDRs se derivarán a partir de un anticuerpo de clase diferente y preferiblemente desde un anticuerpo desde una especie diferente. Se debe enfatizar que puede ser necesario reemplazar todas las CDRs con las CDRs completas desde la región variable donante para transferir la capacidad fijadora de antígenos de un dominio variable a otro. Preferiblemente, puede solo ser necesario transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio fijador de antígenos. Dadas las explicaciones divulgadas en las Patentes estadounidenses No. 5,585,089; 5,693,761; y 5,693,762, esto estará dentro del estado de la técnica, bien sea al realizar experimentación de rutina o mediante prueba de ensayo y error para obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

No obstante las alteraciones a la región variable, se apreciará que los anticuerpos modificados de este invento comprenderán anticuerpos, o fragmentos inmunoreactivos de los mismos, en los cuales al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante ha sido suprimida o de otra manera alterada para proporcionar las características bioquímicas y/o biológicas deseadas tales como localización tumoral aumentada o vida media sérica reducida en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o alterada. En algunas realizaciones, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constant humana. Las modifications a la región constante compatible con este invento comprenden adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados divulgados en la presente pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constant de cadena liviana (CL). En algunas realizaciones del invento, se contemplan regiones constantes modificadas en donde

uno o más dominios son parcial o completamente suprimidos. En otras realizaciones, los anticuerpos modificados comprenderán constructos o variantes con dominios suprimidos en donde tel dominio entero CH2 ha sido retirado (ΔCH2 constructos). En aún otras realizaciones, el dominio de región constante omitido será reemplazado por un espaciador aminoácido corto (ej., 10 residuos) que proporciona alguna de la flexibilidad molecular típicamente impartida por la región constante ausente.

Además de su configuración, se conoce en el estado de la técnica que la región constante media en varias funciones efectoras. Por ejemplo, la fijación del componente C1 de complemento a anticuerpos activa el sistema de complemento. La activación de complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación de complemento también estimula la respuesta inflamatoria y puede estar involucrada en hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se fijan a células vía la región Fc, con un sitio receptor Fc sobre la region Fc de anticuerpo fijandóse a un receptor Fc (FcR) sobre una célula. Existe un número de receptores Fc los cuales son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gama), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) y IgM (receptores mu). La fijación de anticuerpos a receptores Fc sobre superficies celulares dispara un número de respuetas boilógicas importantes y diversas incluyendo inmersión y destrucción de particulas recubiertaas de anticuerpos, depuración de complejos inmunes, lisis de células objetivo recubiertas por anticuerpos mediante células asesinas (llamada citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulina. Aunque varios receptores Fc y sitios receptores han sido estudiados en cierta medida, aún se desconoce mucho acerca de su locación, estructura y funcionamiento.

Mientras no se limite el alcance del presente invento, se cree que los anticuerpos que comprenden regiones constantes modificadas como se describen en la presente responden por las funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la supresión o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la fijación de receptores Fc del anticuerpo modificado circulante aumentado así la locación tumoral. En otros casos puede ser que modificaciones de regiones constantes, consistentes con este

invento, moderen la fijación de complemento y reduzcan así la vida media sérica y asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aún otras modificaciones de la región constante pueden utilizarse para eliminar enlaces de disulfuro o fracciones oligosacaridas que tienen en cuenta la localización aumentada debido a debido a especificidad de antígenos o flexibilidad de anticuerpos aumentadas. De manera similar, modificaciones a la región constante según este invento pueden realizarse facilmente utilizando técnicas de ingeniería bioquímica o molecular bien conocidas.

Se notará que los anticuerpos modificados pueden modificarse genéticamente para fusionar el dominio CH3 directamente a la region de bisagra de los anticuerpos modificados respectivos. En otros constructos puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región de bisagra y los dominios CH2 y/o CH3modificados. Por ejemplo, constructos compatibles podrían expresarse en donde el dominio CH2 ha sido suprimido y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) es unido a la región de bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Tal espaciador puede agregarse, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región de bisagra permanezca flexible. Sin embargo, se debe notar que los espaciadores aminoácidos pueden, en algunos casos, probar ser inmunogénicos y producir una respuesta inmune indeseada contra el constructo. Por consiguiente, cualquier espaciador agregado al constructo debe ser relativamente no inmunogénico o, aún omitido enteramente si las cantidades bioquímicas y/o biológicas deseadas de los anticuerpos modificados van a ser mantenidas.

Ademas de la supresión de los dominios enteros de regiones constantes, se apreciará que los anticuerpos del presente invento pueden encargarse de la supresión o sustitución parcial de un unico aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un unico aminoácido en areas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la fijación Fc y aumentar asi la localización tumoral. De manera similar, puede ser deseable a simple supresión que parte de uno o más dominios de regiones constantes que controlan la función del efector (ej., complemento de fijación Clq) a ser modulado. Tales supresiones parciales de las regiones constantes puedan mejorar caracteristicas seleccionadas del anticuerpo (vida media serica) mientras se dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de región constanteen cuestión. Ademas, como se mencionó anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos divulgados pueden modificarse a traves de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos lo cual aumenta el perfil del constructo

resultate. En cuanto a esto puede ser posible alterar la actividad proporcionada por un stio de fijación conservado (ej., fijación Fc) mientras manteniendo sustancialmente la configuración y el perfil inmunogenico del anticuerpo modificado. Aún otras realizaciones pueden comprender el adicional de uno o más aminoácidos a la región constante para aumentar las caracteristicas deseadas tales como función efectora o encargarse de fijación de más citotoxina o carbohidrato. En tales realizaciones puede ser deseable insertar o replicar secuencias derivadas especificas desde dominios constantes de la región seleccionada.

Este invento también abarca anticuerpos biespecíficos que específicamente reconocen un receptor Notch. Anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer específicamente y fijar al menos dos epitopos diferentes. Los diferentes epitopos pueden cualquiera estar dentro de la molécula misma (ej., el mismo receptor Notch polipéptido) o sobre diferentes moléculas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden reconocer específicamente y fijar un receptor Notch así como también, por ejemplo, 1) una molécula efectora sobre un leucocito tal como un receptor T-célular (ej., CD3) o receptor Fc (ej., CD64, CD32, o CD16) o 2) un agente citotóxico como descrito en detalle en la presente. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos. Técnicas para preparar anticuerpos biespecíficos son comunes en el estado de la técnica (Millstein, 1983, *Nature* 305:537-539; Brennan, 1985, *Science* 229:81; Suresh , 1986, *Métodos en Enzymol.* 121:120; Traunecker, 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby, 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553; Gruber, 1994, *J. Immunol.* 152:5368; y Patente estadounidense No. 5,731,168).

En ciertas realizaciones del invento, puede ser deseable para utilizar un fragmento de anticuerpo, preferiblemente que un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración del tumor, por ejemplo. Varias técnicas son conocidas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos son derivados mediante digestión proteolitica de anticuerpos intactos (por ejemplo Morimoto, 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 y Brennan, 1985, *Science*, 229:81). Sin embargo, estos fragmentos son ahora típicamente producidos directamente por células hospederas recombinantes como descritos en la presente. Así los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv, y scFv pueden ser todos expresados en y secretados de *E. coli* u otras células hospederas, así permitiendo la producción de cantidades grandes de estos fragmentos. Alternativamente, tales fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de los anticuerpos discutidos en la presente. Los fragmentos de anticuerpos también pueden ser anticuerpos lineales como descritos en Patente estadounidense No. 5,641,870, por ejemplo, y pueden ser monoespecificos o biespecificos. Seran aparentemente otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos.

Además puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpos, modificar un anticuerpo con el objeto de aumentar su vida media serica. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante incorporación de un receptor de salvamento fijador epitopo en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o por incorporar el epitopo a una etiqueta de péptido que es luego fusionada a el fragmento de anticuerpo a cualquier extremo o en los medios (ej., por ADN o sintesis de péptido).

El presente invento además incluye variantes y equivalentes los cuales son sustancialmente homologos al quimerico humanizado y anticuerpo humano, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, divulgados en la presente. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones conservadoras de sustitución, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general tales como, por ejemplo, un acidico aminoácido con otro acidico aminoácido, un aminoácido basico con otro aminoácido basico o un aminoácido neutral por otro aminoácido neutral. Lo que es entendido para conservar un aminoácido de sustitución es bien conocido en el estado de la técnica.

El invento también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico. Agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inhbidores de crecimiento, toxinas (ej., una toxina enzimáticamente activa de de origen bacteriano, micótico, vegetal, o animal, o fragmentos de los mismos), isotopos radioactivos (es decir,un radioconjugado), etc. Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercaladores. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse incluyen difteria A cadena, fragmentos activos no fijadores de la toxina de difteria, exotoxin A cadena, ricin A cadena, abrin A cadena, modeccina A cadena, alfa-sarcina, Aleuritos fordii proteínas, diantina proteínas, Fitolaca americana proteínas (PAPI, PAPII, y PAP-S), Momordica charantia inhibidor, curcina, crotina, Sapaonaria inhibidor officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico son hechos utilizando una variedad de agents acopladores de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridiiditiol)-propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehidos (tales

como glutaraldehido), compuestos de bis-azida (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de fluor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliceamicina, maitansinoides, a tricoteno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad tóxica, también pueden utilizarse.

Anticuerpos conjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente unidos. por ejemplo, tales anticuerpos, han sido propuestos para dirigir células inmume a células no deseadas (Patente estadounidense No. 4,676,980). Es comtemplado que los anticuerpos pueden preparse *in vitro* utilizando métodos conocidos en la quimica de proteínas sinteticas, incluyendo esos que involucran agentes eslabonadores. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden contruirse utilizando una reacción de cambio de disulfuro o al formar un enlace de tioeter. Ejemplos de reagentes apropiados para este proposito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

En algunas realizaciones, el anticuerpo del invento contiene regiones de Fc humano que son modificadas para aumentar la función efectora, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependientes de antigeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Esta puede lograrse al introducir una o más sustituciones de amino ácidos en un región de Fc del anticuerpo. Por ejemplo, los residuos cisteinos pueden introducirse en la región de Fc para permitir intercambiar la formación del enlace de disulfuro en esta región para mejorar la muerte célular mediada de complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Caron, 1992, *J. Exp Med.* 176:1191-1195; Shopes, 1992, *Immunol.* 148:2918-2922). Los anticuerpos homodimericos con actividad antitumoral aumentan también pueden prepararse utilizando eslabonadores heterobifuncionales como se describen en Wolff, 1993, *Cáncer Research* 53:2560-2565. Alternativamente, un anticuerpo puede modificarse para tener regiones Fc duales (Stevenson, 1989, *Anti-Cáncer Drug Design* 3:219-230).

Sin importar que tan utiles sean las cantidades obtenidas, los anticuerpos de el presente invento pueden utilizarse en cualquiera de un número de conjugados (es decir, un inmunoconjugado) o formas no conjugadas. Los anticuerpos de este invento pueden utilizarse en una forma de no conjugados o "despojados" para aprovechar los mecanismo naturales de defensa del sujeto incluyendo citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y toxicidad célular dependiente de anticuerpo (ADCC) para eliminar las células malignas. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser conjugados a radioisotopos, incluyendo, pero sin limitar a, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I,

^{123}I, ^{111}In, ^{131}In, ^{212}Bi, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re y ^{188}Re utilizando cualquiera de un número de quelantes o rotulación directa bien conocidos. En otras realizaciones, las composiciones divulgadas pueden comprender anticuerpos aclopados a farmacos, profarmacos o modificadores de respuesta biologica tales como metotrexato, adriamicina, y linfoquinas tales como interferon. Aún otras realizaciones del presente invento comprenden el uso de anticuerpos conjugados a biotoxinas especificas tales como toxina de ricina o difteria. En aún otras realizaciones los anticuerpos modificados pueden ser complejos con otros ligandos inmunologicamente activos (ej., anticuerpos o fragmentos de los mismos) en donde la molecula resultante se fija a ambos la célula neoplastica y un efector célular tal como una célula T. La selección de cual anticuerpo conjugados o no conjugadas modificado utilizar depende del tipo y etapa de cáncer, uso de tratamiento adjunto (ej., quimioterapia o radiacíon external) y la condición del paciente. Se apreciara que alguien facilmente podria hacer tal selección en vista de las enseñanzas de la presente.

La preparación y caracterización de anticuerpos anti-Notch es también enseñada, ej., en Publicación de Solicitud de Patente estadounidense No. 2008/0131434, la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

En ciertas realizaciones, el agente o antagonista Notch fijador es un polipéptido que no es un anticuerpo. Una variedad de métodos para identificar y producir no anticuerpos polipéptidos que se fijan con alta afinidad a un blanco proteico son conocidos en el estado de la técnica. Ver, ej., Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304; Hosse, 2006, *Proteína Science*, 15:14-27; Gill, 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658; Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275:2668-76; y Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275:2677-83, cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. En ciertas realizaciones, se ha utilizado tecnologia de presentación de fagos para identificar producir el polipéptido fijador Notch. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende una proteína de andamiaje de un tipo seleccionado desde el grupo consistente de proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un domimio de repetición de concenso de anquirina, y tioredoxina.

En algunas realizaciones, el agente es una molécula no proteínica. En ciertas realizaciones, el agente es una molécula pequeña. librerias de Quimica Combinatorial y técnicas utiles en la identificación de gentes de fijación Notch no proteínicos son conocidos a aquellos con experiencia en el estado de la técnica. Ver, ej., Kennedy, 2008, *J. Comb. Chem*, 10:345-354; Dolle , 2007, *J. Comb. Chem.*, 9:855-902; y Bhattacharyya, 2001, *Curr. Med. Chem.*, 8:1383-404, cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. En ciertas realizaciones

adicionales, el agente es un carbohidrato, un glicosaminoglicano, una glicoproteina, o un proteoglicano.

En ciertas realizaciones, el agente es un aptamero de ácido nucleico. Los Aptameros son moléculas polinucleotidas que han sido seleccionadas (ej., apartir de grupos aleatorios o mutagenizados) sobre la base de su capacidad para fijarse a otra molecula. En algunas realizaciones, el aptamero comprende un ADN polinucleotido. En ciertas realizaciones alternativas, el aptamero comprende un ARN polinucleotido. En ciertas realizaciones, el aptamero comprende uno o más residuos de ácido nucleico modificados. Los métodos de generar y tamizar aptameros de ácido nucleico para fijación de proteinas son bien conocidos en el estado de la técnica. Ver, ej., Patente estadounidense Nos. 5,270,163; 5,683,867; 5,763,595; 6,344,321; 7,368,236; 5,582,981; 5,756,291; 5,840,867; 7,312,325; y 7,329,742; Publicación de patente internacional Nos. WO 02/077262; WO 03/070984; Publicación de Solicitud de Patente estadounidense Nos. 2005/0239134; 2005/0124565; y 2008/0227735, cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Los anticuerpos del presente invento pueden ser ensayados para fijación inmunoespecífica por cualquier método conocido en el estado de la técnica. incluyen inmunoensayos los cuales pueden utilizarse, pero no se limitan a, sistema de ensayos competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como análisis Biacore, analisis FACS, inmunofluorecencia, inmunocitoquimica, análisis Western blot, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayo tipo "sandwich", ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitanción, reacción de precipitación de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, ensayo de fijación de complemento, ensayo de inmunoradiometrico, inmunoensayo fluorescente, y inmunoensayo de proteína A. Tales ensayos son comunes y bien conocidos en el estado de la técnica (ver, ej., Ausubel , eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, la cual se incorpora en la presente como referencia en en su totalidad).

En algunas realizaciones del presente invento la inmunoespecificidad de un anticuerpo contra un receptor Notch se determinada utilizando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar antígeno, revestir pozos de una placa de microtitulos 96 de pozos con antígeno, agregando el anticuerpo contra un receptor Notch conjugado a un compuesto detectable tal como un estrato enzimatico (ej., peroxidasa de rabano o fosfatasa de alquilino) al pozo, encubando durante un periodo de tiempo y detectando la presencia del antígeno. Alternativamente el anticuerpo contra un receptor Notch no es conjugado a un compuesto detectable, pero en cambio un segundo anticuerpo conjugados que reconoce el anticuerpo contra un receptor Notch es agregado al pozo. Además, en cambio de revestir el pozo con el antígeno, el anticuerpo contra un receptor Notch puede ser revestido al pozo y un segundo anticuerpo conjugados a un compuesto detectable puede ser

agregado despues de la adición del antigeno al pozo revestido. Los parametros que pueden ser modificados para aumentar la señal detectable, así como también otras variaciones de ELISA son bien conocidas en el estado de la técnica (ver ej. Ausubel, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1).

La afinidad de fijación Notch y la tasa de un interacción anticuerpo-antígeno pueden ser determinada por ensayos de fijación competitiva. Un ejemplo de un ensayo de fijación competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno rotulado (ej., ^{3}H o ^{125}I), o fragmento o variante de los mismos, con el anticuerpo de interes en la presencia de cantidades crecientes de un antígeno rotulado seguido por la detección del anticuerpo fijado a el antígeno rotulado. La afinidad del anticuerpo contra un receptor Notch y la fijación tasas puede ser determinada apartir de los datos por análisis Scatchard plot. En algunas de un anticuerpo a un receptor realizaciones, análisis cinetico Biacore es utilizado para determinar la fijación sobre anticuerpos y tasas de anticuerpos contra un receptor Notch. Analizando el análisis cinetico Biacore comprende la fijación y disociación de anticuerpos de chips con antígenos Notch inmovilizados sobre sus superficies.

El invento proporciona polinucleotidos aislados que codifican los polipéptidos de SEQ ID NOs:2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, o 57 así como también los polinucleotidos de SEQ ID NOs: 1, 3, 15, 17, 47 o 48. Los polinucleotidos del invento pueden ser en la forma de ARN o en la forma de ADN, en donde ADN incluye cADN, ADN genomico, y ADN sintetico. El ADN puede ser de hebra doble o de hebra sencilla, y si es de hebra sencilla puede ser la hebra codificadora o la hebra no codificadora (anti-sentido). Así, el término "polinucleotido que codifica un polipéptido" abarca un polinucleotido el cual incluye solamente secuencias codificadoras a el polipéptido así como también un polinucleotido el cual incluye un codificador adicional y/o secuencias no codificadoras. En algunas realizaciones, el invento proporciona un polinucleotido que hibridiza a un polinucleotido que codifican los polipéptidos de SEQ ID NOs:2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, o 57. En algunas realizaciones, los polinucleotidos hibridizan a los polinucleotidos de SEQ ID NOs: 1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 o 60. En algunas realizaciones, los polinucleotidos hibridizan bajo condiciones severas de hibridización. Como se utiliza en la presente, la frases "hibridiza" o "hibridiza selectivamente" o "hibridiza específicamente" se refiere a la fijación o duplexación de solamente una molécula a una secuencia de nucleotidos particulares bajo condiciones severas de hibridización cuando esta secuencia es presentada en una mezcla compleja (ej., una libreria de ADNs o ARNs). Ver, ej., Andersen (1998) Hibridización de Ácido nucleico Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) Hibridización de Ácido nucleico Wiley.

Como se utiliza en la presente, la frase "condiciones severas de hibridización" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda u otro polinucleotido se hibridizara una secuencia objetivo u otra secuencia complementaria, típicamente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero generalmente a ninguna otras Secuencias. condiciones severas son dependientes de la secuencia y será diferente en circunstancias diferentes. Las secuencias mas largas específicamente se hibridizan a temperaturas mas altas. Una amplia guia para la hibridización de ácido nucleicos es encontrada en Tijssen, Técnicas en Bioquimica y Hibridización de Biologia Molecular con Ondas Nucleicas, "Reseña de principios de hibridización y ensayos de estrategia de ácido nucleico" (1993). Generalmente, condiciones severas son seleccionadas para que sean aproximadamente 5-10 °C mas bajas que el punto de fución termal (Tm) para la secuencia especifica a una resistencia ionica definida. El Tm es la temperatura (definida bajo resistencia ionica, pH, y concentración nucleica) a la cual 50% de las sondas complementarias al blanco se hibridiza a la secuencia objetivo en equilibrio (como la secuencias objetivo son presentadas en exceso, a Tm, 50% de las sondas son ocupadas en equilibrio). Condiciones severas serán aquellas en las cuales la concentración de sal es menor que aproximadamente 1.0 M concentración ion de sodio, típicamente aproximadamente 0.01 a 1.0 M concentración ion de sodio (u otras sales) en pH 7.0 a 8.3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para ondas cortas (ej., 10 a 50 nucleotidos) y al menos aproximadamente 60 °C para ondas largas (ej., mas de 50 nucleotidos). Condiciones severas pueden también ser logradas con agentes adicionales de destabilización tales como formamida. Para hibridización de alta severidad, una señal positiva es al menos dos veces hibridización de fondo, o 10 veces hibridización de fondo. Severidad alta de ejemplo o condiciones severas de hibridización incluyen: 50% formamida, 5x SSC, y 1% SDS encubado a 42 °C o 5x SSC y 1% SDS encubado a 65 °C, con un lavado en 0.2x SSC y 0.1% SDS a 65 °C. Para PCR, a temperature de aproximadamente 36 °C es tipico para amplificación de severidad bajo, aunque las temperaturas de recocido pueden variar desde 32 °C a 48 °C aproximadamente dependiendo de la primera longitud. Para amplificación de alta severidad PCR, una temperatura de aproximadamente 62 °C es tipica, aunque las temperaturas de recocido a alta severidad pueden estar entre el rango 50 °C a 65 °C aproximadamente, dependiendo sobre de la primera longitud y especifidad. Condiciones del ciclo tipicas para ambas amplificaciónes de severidad alta y baja incluyen un fase de denaturación de 90 °C a 95 °C durante 30-120 segundos, una fase de recocido que dura 30-120 segundos, y un fase de extension de aproximadamente 72 °C durante 1-2 minutos.

El presente invento se relaciona adicionalmente con variantes de los polinucleotidos descritos anteriormente los cuales codifican los fragmentos, analogos, y derivados. La variante del

polinucleotido puede ser una variente alelica ocurriendo naturamente del polinucleotido o una variente no ocurriendo naturalmente del polinucleotido.

Como se indico anteriormente, el polinucleotido puede tener una secuencia codificadora la cual es una variante alelica ocurriendo naturalmente de la secuencia codificadora de los polipéptidos divulgados. Como conocidas en el estado de la técnica, una variante alelica es una forma alterna de una secuencia de polinucleotidos para tener una sustitución, supresión o adicionales de uno o más nucleotidos que no altera la función sustancialmente del polipéptido codificado.

El presente invento también incluye polinucleotidos, en donde la secuencia codificadora para el polipéptido maduro pueden fusionarse en el mismo marco de lectura a un polinucleotido el cual ayuda en expresión y secreción de un polipéptido desde una célula hospedera, por ejemplo, una secuencia lider la cual funciones como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia lider es una preproteina y puede tener la secuencia lider escindida por la célula hospedera para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleotidos pueden también codificar una proproteina la cual es la proteína madura mas residuos amino ácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosecuencia es una proproteina y es una forma inactiva de la proteína. Una vez escindida la prosecuencia, queda una proteina madura activa.

Así, por ejemplo, el polinucleotido del presente invento puede codificar una proteína madura, o una proteína que tiene una prosecuencia o una proteína que tiene ambas una prosecuencia y una presecuencia (secuencia lider).

Los polinucleotidos del presente invento también pueden tener la secuencia codificadora fusionada en marco a una secuencia marcadora que permite purificación del polipéptido del presente invento. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta hexa-histidina proporcionada por un vector pQE-9 para proporcionar purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un huesped bacteriano. O por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser un hemaglutinina (HA) etiqueta cuando se utiliza un huesped mamifero , ej. células COS-7. La etiqueta HA corresponde a un epitopo derivado apartir de proteina de hemaglutinina de la influenza (Wilson, 1984, *Célula* 37:767).

Además realizaciones del invento incluyen moléculas del ácido nucleico aislado que comprende un polinucleotido que tiene una secuencia nucleotida al menos 90% identica, 95% identica, y en algunas realizaciones, al menos 96%, 97%, 98% o 99% identica a SEQ ID NOs:1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 o 60. En algunas realizaciones, los polinucleotidos que comprende una secuencia nucleotica al menos 90% identica, 95% identica, y en algunas realizaciones, al menos 96%, 97%, 98% o 99% identica hibridizan a los polinucleotidos de SEQ ID NOs:1, 3, 15, 17, 47,

48, 58, 59 o 60. En algunas realizaciones, los polinucleotidos que comprende una secuencia nucleotica al menos 90% identica, 95% identica, y en algunas realizaciones, al menos 96%, 97%, 98% o 99% identica hibridizan a los polinucleotidos de SEQ ID NOs:58, 59 o 60. En algunas realizaciones, los polinucleotidos hibridizan bajo condiciones severas de hibridización. En algunas realizaciones, los polinucleotidos hibridizan a los polinucleotidos de SEQ ID NO:58, 59 o 60 bajo condiciones severas de hibridización. Por un polinucleotido que tiene una secuencia nucleotica, por ejemplo, al menos 95% "identica" a una secuencia nucleotida de referencia se quiere dar a entender que la secuencia nucleotida del polinucleotido es identica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia polinucleotida puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleotidos de la secuencia nucleotida de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleotido que tiene una secuencia nucleotida de al menos 95% identica a una secuencia nucleotida de referencia, hasta 5% de los nucleotidos en la secuencia de referencia pueden ser suprimidos o sustituidos con otro nucleotido, o un número de nucleotidos de hasta 5% de los nucleotidos totales en la secuencia de referencia puede ser insertada en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones de extremo amino o carboxi de la secuencia nucleotida de referencia o cualquier lugar entre esas posiciones de extremo, intermezcladas bien sea individulmente entre nucleotidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como una materia practica, el hecho de que cualquier molécula de ácido nucleico particular tenga un porcentaje de identidad de respuesta seguro a una secuencia de referencia (por ejemplo, tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia o es 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identica a la secuencia de referencia) pueden ser determinadas convencionalmente utilizando programas de computador conocidos tales como el programa Bestfit (Paquete de Análisis de Secuencias Wisconsin, Version 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algorismo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se utiliza Bestfit o cualquier otra secuencia de programa de alineación para determinar si una una secuencia particular es, por ejemplo, 95% identica a una secuencia de referencia según el presente invento, los parametros son colocados, naturalmente, tal que el porcentaje de identidad es calculado sobre la longitud completa de la secuencia nucleotida de referencia y que brechas en homología de hasta 5% del número total de nucleotidos en la secuencia de referencia son permitidas.

Las variantes del polinucleotido pueden contener alteraciones en las regiones codificadoras, las regiones no codidicadoras, o ambas. En algunas realizaciones las variantes del polinucleotido contienen alteraciones las cuales producen sustituciones, adiciones, o supresiones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades de el polipéptido codificador. En algunas realizaciones, variantes nucleotidas son producidas por sustituciones silenciosas debido a la degradación del codigo genetico. Variantes del polinucleotido pueden ser producidas por una variedad de razones, ej., para optimizar expresión de codones para un huesped particular tal como cambiar codones en el mARN humano a aquellos preferidos por un huesped bacteriano tal como *E. coli*.

El presente invento además proporciona composiciones farmacéuticas que comprende antagonistas (ej., anticuerpos) que un receptor Notch objetivo. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en inhibición de crecimiento de células tumorales y tratar cáncer en pacientes humanos.

Formulaciones son preparadas para almacenamiento y utilizadas por combinación un agente fijador Notch purificado o antagonista (ej., anticuerpo) del presente invento con un vehiculo excipiente, y/o estabilizador aceptable farmaceuticamente, como un polvo liofilizado esteril, solución acuosa, etc. (Remington, la Ciencia y Practica de la Farmacia 20th Edition Mack Publishing, 2000). Apropiados vehiculos, excipientes, o estabilizadores comprenden: bufers no toxicos tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales tales como hidrocloruro de sodio; antioxidantes tales como como ácido ascorbico y metionina; preservativos tales como octadecildimetilbencil cloruro de amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro debenzetonio, fenol, butil o alcohol bencilico, alquil parabenos, tales como metil o parabeno de propil, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol; polipéptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 residuos amino ácidos); proteínas tales como albuminio de suero, gelatina, y inmunoglobulinas; polimeros hidrofilicos tales como polivinilpirrolidono; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, y lisina; carbohidratos tales como monosacaridos, disacarios, glucosa, manosa, y dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azucares tales como sacarosa, manitol, trehalosa y sorbitol; contra iones formes formadores de sales tales como sodio; complejos metalicos tales como complejos Zn-proteína; y/o surfactantes no ionicos tales como TWEEN y glicol de polietireno (PEG).

La formación farmaceutica del presente invento puede administrarse en cualquier número de maneras bien sea un tratamiento local o sístemico. La administración pueden ser topica (tal como a membrana muocosa incluyendo liberación vaginal y rectal) utilizando parches transdermales, unguentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, liquidos y polvos; pulmonar (ej., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante neulizador; intratraqueal,

intranasal, epidermal y transdermal); oral; o parenteral incluyendo inyección o infusion intravenosa, intraarterial, subcutanea, intraperitoneal, intratumoral, o intramuscular; o intracranial (ej., intraqueal o intraventricular) administración.

La formación terapeutica puede ser en forma de dosificación unitaria. tales formulaciones incluyen tabletas, pildoras, capsulas, polvos, granulos, soluciones o suspensiones en agua o media no acuosa, o supositorios para administración oral, parenteral, o rectal o para administración por inhalación. En composiciones solidas tales como tabletas el principal ingrediente activo es mezclado con un vehiculo farmaceutico. Los ingredientes convencionales de entabletado incluyen almidon de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido estearico, estereato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y otros diluyentes (ej., agua) para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogenea de un compuesto del presente invento, o una sal no toxica farmaceuticamente aceptable de los mismos. La composición de preformulación sólida es luego subdividida a formas de dosificación unicas del tipo descrito anteriormente. Las tabletas, piloras, etc. de la composición novedosa pueden ser revestidas o de otra manera compuesto para proporcionar una forma de dosificación proporcionando la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o pilora puede comprender una composicion interna por un componente interno. Además, los dos componentes pueden ser separados por un capa enterica que sirve para resistir disintegración y permite al componente interno pasar intacto a traves del estomago o para ser retardado en liberación. Una variedad de materiales pueden utilizarse para tales capas entericas o revestiduras, tales materiales incluyendo un número de ácidos polimericos y mezclas de ácidos polimericos con tales materiales como shellac, alcohol cetilico y acetato de célulosa.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen antagonistas (ej., anticuerpos) del presente invento formando complejo con liposomas (Epstein,, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688; Hwang,, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030; y las Patentes estadounidenses No. 4,485,045 y 4,544,545). Los liposomas con tiempo de circulación aumentado se divulgan en la Patente estadounidense No. 5,013,556. Algunos liposomas pueden generarse mediante la evaporación de fase inversa con una composición lípida que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PE (PEG-PE). Los liposmas son extruidos a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado.

El antagonista (ej., anticuerpo) también puede atraparse en be microcápsulas. Tales microcápsulas son preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y

microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de liberación farmacéutica coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en en *Remington's, The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Mack Publishing (2000).

Además pueden hacerse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos apropiados preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, tales matrices están en la forma de artículos formados (ej., películas o microcápsulas). Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliesteres, hidrogeles tales como poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol), polilactidas (Patente estadounidense No. 3,773,919), copolímeros de ácido L- glutámico y 7 etil-L-glutamato, etilenvinil acetato no degradable, copolímeros de ácido lactic- ácido-glicolico degradables tales como el Lupron Depot (injectable microspheres compuesto de lactic acid-glycolic acid copolímero y leuprolide acetate), sucrose acetate isobutyrate, y poly-D(-)-3-hidroxibutyric acid.
En ciertas realizaciones, the composiciones farmacéuticas comprender ambos the Notch-fijación agente o antagonista y a second terapéuticos agente. En ciertas realizaciones, the second terapéuticos agente es un anti-cáncer agente y/o un anti-angiogenic agente.

El presente invento proporciona métodos para inhibir el crecimiento o proliferación de células tumorales que expresan un receptor Notch utilizando los antagonistas de receptor Notch descritos en la presente. En algunas realizaciones, los métodos comprenden inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan un receptor Notch2 y/o Notch3 que utiliza cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en la presente. En algunas realizaciones, el método de inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan un receptor Notch comprende poner en contacto la célula con un antagonista contra un receptor Notch *in vitro*. Por ejemplo, una línea celular inmortalizada o línea celular cancerígena que expresa un receptor Notch es cultivada en medio al cual es agregado un anticuerpo que se fija específicamente a Notch2 y/o Notch3 e inhibe crecimiento celular. O células tumorales y/o células madre tumorales son aisladas de la muestra del paciente tales como, por ejemplo, una biopsia tisular, efusión pleural, o muestra de sangre y cultivadas en medio al cual es agregado un anticuerpo que se fija

específicamente a Notch2 y/o Notch3 e inhibe crecimiento celular. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que específicamente reconoce un epitopo de un receptor Notch2 y/o Notch3.

En algunas realizaciones, el método de inhibición el Crecimiento o proliferación de células tumorales que expresan a receptor Notch comprende contacting la célula con un antagonista contra un receptor Notch (ej., un antagonista de Notch2 y/o Notch3) *in vivo*. En ciertas realizaciones, poner en contacto una célula tumorigénica con un antagonista a un receptor Notch es realizado en un modelo animal. Por ejemplo, xenoinjertos que expresan un receptor Notch son cultivados en ratones inmunocomprometidos (ej., ratones NOD/SCID). Los ratones son administrados con un antagonista al receptor Notch para inhibir crecimiento tumoral. Alternativamente, células madre cancerígenas que expresan un receptor Notch son aisladas de la muestra del paciente tales como, por ejemplo, una biopsia tisular, efusión pleural, o muestra de sangre e inyectadas en ratones inmunocomprometidos. Luego los ratones son administrados con un antagonista contra el receptor Notch para inhibir crecimiento de células tumorales. En algunas realizaciones, el antagonista de un receptor Notch es administrado al mismo tiempo o inmediatamente después de la introducción de células tumorales en el animal para prevenir crecimiento tumoral. En otras realizaciones, el antagonista de un receptor Notch es administrado como un terapéutico después de que las células tumorales han crecido a un tamaño especificado. En algunas realizaciones, el antagonista es una fusión proteica de receptor Notch que específicamente se fijaa un receptor Notch. En ciertas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que específicamente reconoce un epitopo de un receptor Notch. En algunas realizaciones, el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en la presente.

En ciertas realizaciones, poner en contacto una célula tumorigénica con un antagonista a un receptor Notch es realizado en un paciente humano diagnosticado con cáncer. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que específicamente se fija a un receptor Notch. En otras realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que específicamente reconoce un epitopo de un receptor Notch. Por ejemplo, el invento proporciona un método de inhibición de crecimiento de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista

de Notch2 humano y/o Notch3. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que fija a Notch2. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que fija a Notch3. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo que fija a Notch2 y Notch3. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo o polipéptido como se describe en en cualquiero de los aspectos o realizaciones antes realizados, así como también cualquier otros aspectos o realizaciones descritos en la presente. En ciertas realizaciones, el tumor comprende una supresión inactivadora o mutación en la fosfatasa y gen homólogo de tensina (PTEN).

El invento además proporciona métodos de inhibición de señalización Notch (ej., Notch2 y/o Notch3) en una célula, que comprende contactar la célula con una cantidad efectiva del Notch antagonista. Estos métodos pueden ser *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones, el Notch antagonista es un anticuerpo. En algunas realizaciones, los métodos que comprenden inhibición sw señalización Notch2 en una célula que comprende contactar la célula con una cantidad efectiva de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de los aspectos o realizaciones antes mencionadas, así como también cualquier otros aspectos o realizaciones descritos en la presente. En algunas realizaciones, el Notch antagonista es un anticuerpo. En algunas realizaciones, los métodos comprender inhibición Notch3 señalización en una célula que comprende contactar la célula con una cantidad efectiva de cualquier de los anticuerpos o polipéptidos de los aspectos o realizaciones antes mencionadas, así como también cualquier otros aspectos o realizaciones descritos en la presente.

El invento además proporciona un método para la modulación la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular, que comprende administrar una cantidad efectiva de un antagonista de Notch3 humano al sujeto. En algunas realizaciones, el método inhibe angiogenesis para modular la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular. En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo o polipéptido como se describe en cualquier de los aspectos o realizaciones antes mencionadas, así como también cualquier otros aspectos o realizaciones descritos en la presente. En ciertas realizaciones, el desarrollo vascular que es inhibido es desarrollo vascular aberrante. En ciertas realizaciones, el desarrollo vascular que es inhibido es en un tumor. En ciertas

realizaciones, el método además comprende administrar al sujeto un antagonista de VEGF o de a VEGF receptor.

Además, el invento proporciona métodos de inhibir angiogenesis o desarrollo vascular en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un Notch antagonista al sujeto. En ciertas realizaciones, el Notch antagonista es un Notch3 antagonista. En ciertas realizaciones, el Notch antagonista es un Notch2 antagonista. En ciertas realizaciones, el antagonista es un antagonista de Notch2 y/o 3. En algunas realizaciones, el antagonista es un anti-Notch2/3 anticuerpo. En algunas realizaciones, los métodos de inhibir angiogenesis comprenden administrar un anticuerpo o polipéptido de cualquiera de los aspectos o realizaciones antes mencionadas, así como también cualquier otra realización o aspecto descrito en la presente. En ciertas realizaciones, el angiogenesis es angiogénesis tumoral. En ciertas realizaciones, el desarrollo vascular es en el sitio de un tumor. En ciertas realizaciones alternativas, el angiogenesis es angiogénesis no tumoral. En ciertas realizaciones, la inhibición de angiogenesis o desarrollo vascular es debida, al menos en parte, a la modulación de la función de pericitos y/o células de musculo liso vascular. En ciertas realizaciones, el método además comprende administrar al sujeto un antagonista de factor celular de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de un receptor VEGF.

Métodos de reducir la tumorigenicidad de un tumor (ej., a tumor que comprenden células madre cancerígenas) también se proporcionan. En ciertas realizaciones, los métodos comprender administrar a un sujeto en necesidad de las mismas (ej., el sujeto tiene un tumor) una cantidad terapéuticamente efectiva del Notch antagonista. En ciertas realizaciones, el Notch antagonista es un anticuerpo que fija Notch2. En ciertas realizaciones, el Notch antagonista es un anticuerpo que fija Notch3. En ciertas realizaciones, el Notch antagonista es un anticuerpo que fija Notch2 y Notch3. En ciertas realizaciones, el Notch antagonista es un anticuerpo o polipéptido de cualquier de los aspectos o realizaciones antes mencionadas, así como también cualquier otra realización o aspecto descrito en otra parte en la presente. En ciertas realizaciones, la frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor es reducida mediante administración del anticuerpo. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor colorectal, tumor de mama, tumor pancreático o melanoma.

Adicionalmente se contempló que los agentes y antagonistas del presente invento pueden utilizarse para tratar varias condiciones caracterizados por expresión de y/o sensibilidad aumentada de células a un receptor Notch. El invento proporciona métodos de tratar enfermedad proliferativa, tales como cáncer, enfermedades asociadas con angiogenesis (ej., enfermedades dependientes de angiogenesis), y enfermedades en las cuales la regulación positiva o negativa de señalización Notch juega un papel.

En ciertas realizaciones la enfermedad ha ser tratada con los agentes fijadores Notch o antagonistas es una enfermedad Notch-relacionada. En ciertas realizaciones, la enfermedad es caracterizada por regulación positiva o negativa de señalización Notch (ej., señalización Notch2 y/o Notch3). En ciertas realizaciones, la enfermedad o tumor es dependiente a Notch2 y/o Notch3.

Particularmente, se contempla que los antagonistas (ej., anticuerpos) contra un receptor Notch se utilizara para tratar trastorno proliferativos incluyendo, pero sin limitar a, benigno y maligno tumores del riñon, hígado, vejiga, mama, estómago, ovario, colón, recto, próstata, pulmón, vulva, tiroides, cabeza y cuello, cerebro (glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, etc.), sangre y linfa (leucemias y linfomas). En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo en que se utiliza agente de fijación Notch o antagonista para tratar es cáncer colorectal, cáncer de mama, cáncer pancreático, o melanoma. En ciertas realizaciones, el cáncer comprende células madre cancerígenas.

En ciertas realizaciones, los tumores tratados son tumores sólidos. Ejemplos de tumores sólidos que pueden tratarse utilizando una composición terapéutica de del presente invento, por ejemplo, un anticuerpo que fija Notch incluye, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, sarcoma osteogénico, córdoma, angiosarcoma, endotelialsarcoma, linfaangiosarcoma, linfaangioendotelialsarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de cólon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer prostático, carcinoma de célula escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcima de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma de ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor

testicular, pulmón carcinoma, carcinoma de pulmón de célula pequeña, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. El invento es aplicable a sarcomas y cánceres epiteliales, tales como cánceres ováricos y cánceres de mama. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor colorectal, tumor de mama, tumor pancreático, o melanoma. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor ovario. En ciertas realizaciones, el tumor es un meduloblastoma. En ciertas realizaciones, el tumor comprende células madre cancerígenas.

En ciertas realizaciones, la enfermedad a ser tratada con el agente de fijación Notch o antagonista es una enfermedad asociada con angiogenesis. En ciertas realizaciones, la enfermedad es cáncer. En ciertas otras realizaciones, la enfermedad no es una condición cancerígena. Por ejemplo, la enfermedad pueden ser degeneración macular húmeda, degeneración macular relacionada a edad, retinopatía diabética, a hemangioma, artritis reumatoidea, psoriasis, glaucoma neovascular, enfermedad policística de ovario, endometriosis y transtornos inflamatorios de intestino.

En ciertas realizaciones, el tumor expresa el receptor Notch o receptores a los cuales el agente de fijación Notch o antagonista es direccionado. En ciertas realizaciones, el tumor expresa Notch2 y/o Notch3. En ciertas realizaciones, el tumor sobre-expresa Notch2 y/o Notch3. En ciertas realizaciones, el tumor es dependiente ante uno o más receptores Notch a los cuales el anticuerpo administrado específicamente se fije a. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo que específicamente se fije un Notch2 (o Notch2 y Notch3) pueden ser utilizado para inhibir el crecimiento o de otra manera dirigir el tumor dependiente a Notch2. En ciertas realizaciones, un anticuerpo que específicamente se fije a Notch3 (o Notch2 y Notch3) puede ser utilizado para inhibir el crecimiento o de otra manera dirigir el tumor dependiente a Notch3. En ciertas realizaciones, el tumor comprende células madre cancerígenas.

En ciertas realizaciones, el tumor es homocigótico o heterocigótico para una supresión inactivadora o mutación en el gen que codifica el la fosfatasa de tumor supresor y homologo tensil (PTEN). En ciertas realizaciones, el tumor que comprende la supresión o mutación es un tumor de mama.

Los antagonistas son administrados como una composición farmacéutica apropiada a un paciente humano según métodos conocidos. Métodos apropiados de administración incluyen administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por rutas intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, intratumorales, intraarteriales, intracerobroespinales, subcutáneas, intra-articulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicas, o de inhalación.

En ciertas realizaciones, además para administrar un Notch antagonista, el método o tratamiento además comprende administrar un segundo agente terapéutico (antes de, concurrentemente con, y/o subsiguientemente a administración del antagonista Notch). En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un agente anti-cáncer y/o anti-angiogénico. Composiciones farmacéuticas que comprenden el Notch antagonista y el segundo agente terapéutico también se proporcionan.

Se apreciará que la combinación de un Notch antagonista (ej., anticuerpo) y un segundo agente terapéutico pueden ser administrados en cualquier orden o concurrentemente. En realizaciones seleccionadas, los antagonistas Notch se administraran a pacientes que previamente han sido tratados con el segundo agente anti-cáncer. En ciertos otras realizaciones, el Notch antagonista y el segundo agente terapéutico se administrara sustancialmente simultáneamente o concurrentemente. Por ejemplo, un sujeto puede ser dado el Notch antagonista mientras experimenta un curso de tratamiento con el segundo agente terapéutico (ej., quimioterapia). En ciertas realizaciones, el Notch antagonista se administrara dentro de 1 año del tratamiento con el segundo agente terapéutico. En ciertas realizaciones alternativas, el Notch antagonista se administrara dentro de 10, 8, 6, 4, o 2 meses de cualquier tratamiento con el segundo agente terapéutico. En ciertos otras realizaciones, el Notch antagonista se administraran dentro de 4, 3, 2, o 1 semanas de cualquier tratamiento con el segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, el Notch antagonista se administraran dentro de 5, 4, 3, 2, o 1 días de cualquier tratamiento con el segundo agente terapéutico. Se apreciará además que los dos agentes o tratamiento pueden ser administrado al sujeto en cuestión de horas o minutos (es decir, sustancialmente simultáneamente).

Clases útiles de agentes anti-cáncer incluyen, por ejemplo, agents antitubulinos, auristatinos, enlazadores de ranura menores de ADN, inhibidores de replicación de ADN,

agentes alquilantes (ej., complejos de platino tales como cisplatino, mono(monoplatino), bis(monoplatino) y complejos tri-nucleares de platino y carboplatino), antraciclinos, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensitizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etoposidas, pirimidinas fluorinadas, ionóforas, lexitropsinas, nitrosoureas, platinols, compuestos ejecutores, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensitizadores de radiación, estéroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides vinca, o similares. En ciertas realizaciones, el segundo agente anti-cáncer es un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa, o un inhibidor de angiogenesis.

Agentes anticáncer que pueden ser administrados en combinación con los antagonistas Notch incluye agentes quimioterapéuticos. Así, en algunas realizaciones, el tratamiento involucra la administración combinada de un antagonista del presente invento y un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples diferentes agentes quimioterapéutico. Tratamiento con un antagonista puede ocurrir anterior a, concurrentemente con, o subsiguientemente a administración de quimioterapias. Quimioterapias contempladas por el invento incluyen sustancias químicas o drogas que son conocidas en el estado de la técnica y son comercialmente disponibles, tales como doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinosida de citosina (Ara-C), ciclofosfaminda, tiotepa, busulfan, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalano, vinblastina y carboplatino. Administración combinada puede incluir co-administración, ya sea en una sola formulación farmacéutica o utilizando formulaciones separadas, o administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de de un periodo de tiempo tal que todos los agentes activos pueden ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. Preparación y esquemas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse según instruciones de manufactureros o como empiracamente se determina. Preparación y esquemas de dosificación para tales quimioterapias son también descritas en Servicio de Quimioterapia Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

Agentes quimioterapéuticos útiles en el presente invento también incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfaminda (CYTOXAN); sulfonatos de alquilo tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosfaoramida

y trimetilolomelamima; mostazas de nitrgeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfaminda, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina de oxido de hidrocloruro, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliceamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenolico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido folíco tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; androgenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimia, mitotano, trilostano; restaurador del ácido folico tales como ácido frolinico; aceglatona; aldofosfaminda glicosido; ácido aminolevulinico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatin; fenamet; pirarubicin; ácido podofilinico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK.; razoxano; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2''-trichlorotrietilamina; uretan; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida (Ara-C); ciclofosfaminda; tiotepa; taxoidos tales como paclitaxel (TAXOL) y doxetaxel (TAXOTERE, Rhone); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos monoplatinos tales como cisplatin y carboplatin; vinblastina; monoplatino; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitomicin C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposida; daunomicin; aminopterin; xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidor topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitino (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales

aceptables farmaceuticamente, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes anti-hormonales que actuan para regular o inhibir la acción de la hormona sobre tumores tales como anti-estrogenos incluyendo por ejemplo tamoxifen, raloxifeno, aromatasa inhibición 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifen, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrogenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelin; y sales aceptables farmaceuticamente , ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa. Inhibidores de topoisomerasa son agentes de quimioterapia que interfieren con la acción de una enzima topoisomerasa (ej., topoisomerasa I o II). Inhibidores topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, doxorubicin HCL, citrato de daunorubicin, mitoxantrona HCL, actinomicin D, etoposida, topotecan HCL, teniposida (VM-26), e irinotecan. En ciertas realizaciones, el segundo agente anticancerígeno es irinotecan. En ciertas realizaciones, el tumor ha ser tratado es un tumor colorectal y el segundo agente anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa, tales como irinotecan.

En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un anti-metabolito. Un anti-metabolito es un químico con una estructura que es similar a un metabolito requerido para reacciones bioquímicas normales, aún suficientemente diferentes para interferir con una o más funciones celulares normales, tales como división celular. Anti-metabolitos incluyen, pero no se limitan a, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, sodio de metotrexato, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, citosina arabinosida, tioguanina, 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatin, fosfato de fludarabina, y cladribina, así como también sales aceptables farmaceuticamente , ácidos, o derivativos de cualquiera de estos. En ciertas realizaciones, el segundo agente anti-cancer es gemcitabina. En ciertas realizaciones, el tumor ha ser tratado es un tumor pancreatico y el segundo agente anti-cancer es un anti-metabolito (ej., gemcitabina).

En otras realizaciones, el tratamiento involucra la administración combinada de un antagonista del presente invento y terapia de radiación. El tratamiento con un antagonista puede ocurrir antes de, concurrentemente con, o subsiguientemente a administración de terapia de radiación. Cualquier esquema de dosificación para tal terapia de radiación puede utilizarse.

En otras realizaciones, el tratamiento puede involucrar la administración combinada de anticuerpos del presente invento con otros anticuerpos contra antigenos tumorales asociados adicionales incluyendo, pero sin limitar a, anticuerpos que fijan al receptor EGF (EGFR) (ej., Erbitux®), el receptor erbB2 (HER2) (ej., Herceptin®), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (ej., Avastin®). En ciertas realizaciones alternativas, el segundo agente anti-cancer comprende un anticuerpo que específicamente se fija a DLL4 humano u otro ligando de un receptor Notch o un anticuerpo que específicamente se fija a un receptor Notch humano adicional. De ejemplo, anticuerpos anti-DLL4, son descritos, por ejemplo, en Publicación de Solicitud de Patente estadounidense No. US 2008/0187532, incorporada en la presente como referencia en su totalidad. Anticuerpos adicionales anti-DLL4 son descritos en, ej., Publicación Internacional de Patente Nos. WO 2008/091222 y WO 2008/0793326, y Publicación de Solicitud de Patente estadounidense Nos. US 2008/0014196, US 2008/0175847; US 2008/0181899; y US 2008/0107648, cada de la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Anticuerpos de ejemplo anti-Notch, son descritos, por ejemplo, en Publicación de Solicitud de Patente estadounidense No. US 2008/0131434, incorporada en la presente como referencia en su totalidad. En ciertas realizaciones, el segundo agente anti-cancer es un inhibidor de señalización Notch. En ciertas realizaciones, el segundo agente anti-cáncerigeno es un anticuerpo que es un inhibidor de angiogenesis (ej., un anticuerpo anti-VEGF). En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que específicamente se fija a un receptor VEGF. En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico es AVASTIN (bevacizumab), HERCEPTIN (trastuzumab), VECTIBIX (panitumumab), o ERBITUX (cetuximab). Administración combinada puede incluir co-administración, cualquiera en una única formulación farmacéutica o utilizando formulaciones separadas, o administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un periodo de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultaneamente.

Además, el tratamiento puede incluir administración de uno o más citoquinas (ej., linfaoquinas, interleuquinas, factores de necrosis tumoral, y/o factores de crecimiento) o pueden acompañarse mediante el retiro quirúrgico de células cancerígenas o cualquier otra terapia necesaria por el medico encargado.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un antagonista del presente invento depende del tipo de enfermedad a tratar, la severidad y el curso de la enfermedad, la sensibilidad de la enfermedad, es administrado el propósito terapéutico o preventivo del antagonista, la terapia previa, la historia clinica del paciente, etc, todo a discreción del medico encargado. El antagonista puede administrarse una vez o acerca de unas series de tratamientos durando desde días rigurosos a meses rigurosos, o hasta que una cura sea efectiva una disminución del estado de la enfermedad esta aumentando (ej., reducción en el tamaño del tumor). Esquemas de dosificación óptimos pueden calcularse desde misiones de acumulación de farmacos en el cuerpo del paciente y variarían dependiendo de la potencia relativa de un antagonista individual. El medico encargado de administrar puede facilmente determinar dosis optimas, métodologias dosificadoras y tasas de repetición. En general, la dosificación esta entre 0.01 μg a 100 mg por kg de peso corporal, y puede suministrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. El medico encargado puede estimar tasas de repetición para dosificación con base en tiepos de residencia y concentraciones del farmaco en fluidos o tejidos corporales.

En ciertas realizaciones, los pacientes bajo consideración para tratamiento con el antagonista Notch son tamizados antes de tratamiento con el Antagonista Notch. En ciertas realizaciones, un tumor en a paciente o un tumor que ha sido retirado de un paciente es probado para la presencia de células madre cancerígenas. En ciertas realizaciones, el tumor es probado para la expresión del uno o más receptores Notch (ej., Notch2 y/o Notch3) a los cuales el antagonista se fija. En ciertas realizaciones, el tumor es probado para la presencia de una supresión inactivadora o mutación en el gen que codifica el tumor el homologo de fosfatasa y tensina supresor (PTEN). En ciertas realizaciones, el tumor asi probado es un tumor de mama.

Por ejemplo, el invento proporciona un método de seleccionar un sujeto para tratamiento con un antagonista Notch2 y/o Notch 3, en donde el sujeto tiene un tumor o a tenido un tumor removido. En ciertas realizaciones, el método comprende (a) determinar si el tumor comprende una supresión o mutación en el gene PTEN, y (b) seleccionar el sujeto para tratamiento con el antagonista Notch 3 si el tumor comprende la supresión o mutación.

En ciertas realizaciones alternativas del presente invento, pacientes tamizados para la presencia de adenomas o pólipos del colon son probados para perdida alelica y

mutaciones somáticas mediante una prueba genética. En algunas realizaciones los tamices de prueba genética para pérdida o mutaciones en la ruta Wnt incluyendo, por ejemplo, en APC, Axin2 o beta-catenin.

En otro aspecto, el presente invento proporciona kits que pueden utilizarse para realizar los métodos descritos en la presente. En algunas realizaciones, un kit comprende un anticuerpo o anticuerpos específicos para un receptor Notch, un anticuerpo o anticuerpos purificados, en uno o más recipientes. En algunas realizaciones, un kit además comprende un receptor Notch sustancialmente aislado que comprende un epitopo que es específicamente inmunoreactivo con el anticuerpo o anticuerpos incluidos en el kit, un anticuerpo de control que no reacciona con el receptor Notch, y/o un medio para detectar la fijación de un anticuerpo a un receptor Notch (tales como, por ejemplo, un cromoforo fluorescente , un substrato enzimatico , un compuesto radioactivo o un compuesto luminiscente conjugado al anticuerpo contra un receptor Notch o a un segundo anticuerpo que reconoce el anticuerpo contra un receptor Notch). En otras realizaciones, un kit comprende reactivos especificos para la detección de ARNm o cADN (ej., oligonucleótido de sondas o cebadores) de uno o más receptores Notch. En algunas realizaciones, los kits contienen todo de los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, direcciones para realizar ensayos, y cualquier software necesario para análisis y presentación de resultados.

Un kit de compartimiento incluye cualquier kit en el cual reactivos son obtenidos en recipientes separados. Tales recipientes incluyen recipientes pequeños de vidrio, recipientes plasticos o tiras de plastico o papel. Tales recipientes permiten transferir reactivos eficientemente desde un compartimiento a otro compartimiento tales que las muestras y reactivos no se contaminen de manera cruzada, y los agentes o soluciones de cada recipiente puedan agregarse en una forma cuantitativa desde un compartimiento a otro. Tales recipientes incluiran un recipiente el cual aceptara la muestra del examen, un recipiente el cual contiene los anticuerpos o sondase utiliza en los métodos, recipientes los cuales contienen reactivos lavados (tales como solución salina amortiguada por fosfato, Tris-bufers, etc.), y recipientes los cuales contienen el reactivo se utiliza para detectar el anticuerpo o sonda fijado. Alguien fácilmente reconocerá que los polinucleotidos,

polipéptidos y anticuerpos divulgados del presente invento pueden facilmente incorporarse en uno de los formatos de kit establecidos en el estado de la técnica.

En algunas realizaciones, el invento además proporciona un kit que comprende un agente fijador Notch o antagonista y un segundo agente terapéutico. En ciertas realizaciones, el agente fijador Notch o antagonista es un anticuerpo que específicamente se fija a Notch 2 y/o Notch3. En ciertas realizaciones, el agente fijador Notch o antagonista es un anticuerpo que específicamente se fija a Notch 2 y Notch3. En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un agente anti-cáncerigeno y/o un agente anti-angiogenico.

En un aspecto, el presente invento proporciona un método de identificar una molécula que fija a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe crecimiento tumoral, el método que comprende: i) encubar la molécula con el dominio no fijador de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch humano; ii) determinar si la molécula se fija a la región no fijadora de ligandos del dominio extracelular del receptor Notch humano; y iii) determinar si la molécula inhibe crecimiento tumoral. Las moleculas que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano incluyen, pero no se limitan a, pequeñas moléculas orgánicas, polipéptidos, y anticuerpos.
Tamizaje puede realizarse utilizando cualquier apropiado método conocidos en el estado de la técnica. En ciertas realizaciones, el Tamizaje es realizado *in vitro*. En algunas realizaciones, células que expresan una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano son encubadas con una molécula roturadora y fijación específica de la molécula roturadora a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano es determinada por análisis FACS. En algunas realizaciones, una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano es expresada por presentación de fagos, y son identificadas moléculas que específicamente se fijan a una región no fijadora del dominio extracelular de un receptor Notch humano. Otros métodos apropiados para identificar moléculas que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos de un receptor Notch humano incluyen, pero no se limitan a, ELISA, Western blotting (o inmune), y levadura-dos-híbridos.

Moléculas que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de un receptor Notch humano son luego probadas para inhibición de crecimiento de células tumorales. Exámenes pueden realizarse utilizando cualquier método apropiado conocido en el estado de la técnica. En ciertas realizaciones, moléculas que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano son probados para la capacidad de inhibir crecimiento tumoral *in vitro*. En algunas realizaciones, moléculas que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano son encubadas con células tumorales en cultivo y proliferación de células tumorales en la presencia de una molécula que específicamente se fija a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano es determinada y comparada a células tumorales encubadas con una molécula no fijadora de control. En ciertas realizaciones, moléculas que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano son probados para la capacidad de inhibir crecimiento tumoral *in vivo*. En ciertas realizaciones, moléculas que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano son inyectadas a un modelo animal o de xenoinjerto y el crecimiento tumoral en animales tratado con moléculas que específicamente se fijan a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de un receptor Notch humano es determinada y comparada a animales tratados con un molécula de control no fijadora.

EJEMPLOS

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritas aquí tienen propósitos ilustrativos únicamente y que se sugerirá a la persona medianamente versada en la materia varias modificaciones o cambios y se incluirán dentro del espíritu y alcance de la presente solicitud.

Ejemplo 1.

Producción de anticuerpos humanos para Notch2

Los anticuerpos humanos que reconocen específicamente la porción de unión al no ligando del dominio extracelular del receptor Notch2 se aislaron usando tecnología de expresión en fagos (*phage display*). Se tamiza un catálogo de anticuerpos sintéticos que contiene dominios variables de anticuerpos humanos, para el reconocimiento específico y de alta afinidad del receptor Notch2.

Brevemente, $2x10^{13}$ el fragmento de unión al antígeno (Fab) que expresa partículas de bacteriófago fueron incubadas mediante inmovilización pasiva con una región de anticuerpo (Fc) recombinante de la proteína de fusión Notch2 (SEQ ID NO:21) que comprende el sitio de unión del ligando extracelular del Notch2 y EGF circundante (EGF1-12) repiten en la primera ronda. El bacteriófago no específico se lavó, luego el bacteriófago específico se eluyó con DTT. El resultado de lo eluido se usó para infectar la bacteria TG1F, rescatada con un bacteriófago ayudador, y luego el Fab expresado es inducido con IPTG (0,25mM). Este proceso se repitió por dos rondas adicionales y luego, la ronda tres se prueba en ELISA contra el Fc recombinante del Nocht2 (EGF1-12) de fusión (5 μg/ml).

Se identificó que un Fab particular (59R1) se une al receptor Notch2 humano y bloquea la unión de la proteína Jagged1 al Notch2 humano. La unión del Fab 59R1 al Notch2 humano se verificó mediande un ensayo FACS usando la línea celular humana HEK-293 estable, que sobre expresa Notch2 humano (hN2) (Figura 1A). La unión del Fab se detectó mediante ficoeritrina (PE) conjugada con Fab anti-humano de cabra (Jackson Inmunochemicals). El Fab 59R1 (referenciado en la Figura 1A como Clon 1) demostró buena unión al hN2. El Fab 59R1 también demostró buena actividad bloqueante contra el ligando humano Notch Jagged1 en un ensayo de unión usando la misma línea celular estable (Fig. 1B). La unión y el bloqueo al ligando se determinó mediante incubación del dominio extracelular del Jagged1 (ECDI) fusionado con Fc humana de región constante junto con células y Fabs seleccionados del catálogo de bacteriófagos y usando para la detección anticuerpos Fc gamma específicos de cabra anti-humano PE-conjugados (Jackson Inmunochemicals).

Las secuencias de VH y VL del Fab 59R1 se proporcionan en la SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 (incluyendo las secuencias de señal N-terminal bacteriana que son escindidas en la secreción) respectivamente. Las CDRs del Fab 59R1 son como se indica en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2. CDRs del Fab 59R1 humano y anticuerpos IgG

	Cadena Pesada			Cadena Liviana		
Cabeza	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
59R1	SSSGMS (SEQ ID NO:5)	VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)	GIFFAI (SEQ ID NO:7)	RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)	GASSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYSNFPI (SEQ ID NO:10)

Las regiones variables basadas en aquellas del Fab 59R1 fueron clonadas en vectores de expresión Ig que contienen la cadena pesada de IgG2 humana y la cadena liviana kappa, junto con sus respectivas secuencias de señal de mamíferos para la expresión de células Ováricas de Hámster Chino (CHO). La VH y VL del anticuerpo IgG 59R1 se proporciona como la SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo IgG 59R1 (incluyendo las secuencias de señal) se proporcionan como SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18, respectivamente. La secuencia de señal en el N-terminal de la secuencia de aminoácidos de cada cadena es escindida en la secreción. La secuencia de ácidos nucléicos que codifican para las cadenas pesada y liviana del anticuerpo IgG 59R1 se proporcionan como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3, respectivamente. La purificación de la proteína A se usó para purificar los anticuerpos. El plásmido bacteriano DNA que contiene un inserto de DNA sintético que codifica para el DNA de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo IgG2 50R1 se depositó como "59R1" junto con el ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, bajo condiciones del tratado de Budapest de Octubre 15, 2008, y se le asignó el número de denominación PTA-9547.

Adicionalmente, se ensayó la habilidad del anticuerpo IgG2 59R1 para bloquear el DLL4 del receptor Notch2 humano mediante un análisis FACS. Se incubaron las células HERK-293 que sobre expresan establemente Notch2 humano junto con el anticuerpo a varias concentraciones y luego se detectó la unión hNotch2 (Figura 1C) mediante PE-conjugada con anticuerpos específicos Fc gamma anti-humanos de cabra, o bloqueando la actividad

del ligando (Figura 1D). El bloqueo del ligando se determina mediante la incubación de las células con DLL4 ECD humano etiquetado con la región constante del Fc de conejo y el anticuerpo 59R1 a un rango de concentraciones, y luego detectando el hDLL4 mediante PE-conjugado con anticuerpo anti-conejo de burro. La unión del hNotch2 y la actividad bloqueante del ligando fueron confirmadas para el anticuerpo IgG2 59R1.

Una variante de la línea germinal del 59R1 (en adelante "59RGV") también fue expresada y purificada. La VH y VL del anticuerpo 59RGV se proporciona como la SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo 59RGV (incluyendo las secuencias de señal) se proporcionan como SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente. La secuencia de señal en el N-terminal de la secuencia de aminoácidos de cada cadena es escindida en la secreción. La secuencia de ácidos nucléicos que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo 59RGV se proporcionan como SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17, respectivamente.

CDRs altamente hidrofóbicos tienen el potencial, en ciertos casos, de permitir una unión no específica por un anticuerpo no favorable. Ya que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR3 del 59R1 tiene un grado inusual de caracteres hidrofóbicos, se producen variantes del 59R1 que contienen la secuencia de la cadena pesada CDR3 con caracteres hidrofóbicos. La determinación de la afinidad de maduración de la cadena pesada CDR3 se llevó a cabo permitiendo cambios restringidos de la secuencia madre (GIFFAI; SEQ ID NO:7) como se muestra en la Figura 1E. Se permitió el cambio de los aminoácidos permitidos en cada posición a partir de residuos de la madre a los residuos indicados en la Figura 1E. Se aislaron variantes mejoradas ensayándoles su habilidad para bloquear el JAG1 mejorada como se muestra en la Figura 1F (indicada con flechas). Brevemente, los Fabs (1 and 10 μg/ml) se mezclaron con hJAG1-rb Fc (previamente agrupados 5 μg/ml con 2μg/ml de PE-conjugado anti-conejo de burro) y luego adicionados a las células HEK-293 hNotch2 transfectadas establemente. La unión a hJAG1 se valoró usando citometría de flujo. Seis variantes mejoradas (versus Fab 59R1) se aislaron y sus secuencias HC CD3 fueron como sigue: SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26), y SSFFAN (SEQ ID NO:27). Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada

para estas variantes son las secuencias SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, y SEQ ID NO:57.

Ejemplo 2

Reactividad cruzada y afinidad de unión del anticuerpo anti-Notch2/3 59R1

La habilidad del anticuerpo IgG2 59R1 de hacer reacción cruzada con otros receptores Notch se determinó mediante el ensayo FACS usando células HEK-293 transitoriamente transfectadas con el plásmido de expresión Notch1, Notch2, Notch3 o Notch4 y la proteína verde fluorescente (GFP) como control de transfección. Las células positivas con GFP indicaron la expresión del transgén. La IgG2 59R1 se adicionó a las células a 2μg/ml y se detectó mediante anticuerpos Fc gamma específicos de cabra anti-humano PE-conjugados (Jackson Inmunochemicals). Todas las constructos fueron de longitud completa. Los resultados se muestran en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, el anticuerpo IgG2 59R1 se une específicamente tanto a Notch3 humano como a Notch2 humano, pero no se une significativamente al Notch1 humano de larga duración o
Al Notch4.

La afinidad por los Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4 humano y de ratón se determinó usando un instrumento Biacore 2000. De manera breve, las proteínas recombinantes Notch de humano y ratón (EGF10-15 para Notch 1, 2 y 4; EGF9-14 para Notch 3) se inmovilizaron en un chip CM5 usando química basada en aminas estándar (NHS/EDC). El EGF1-12 también se probó para unión para hNotch2. Se inyectaron diferentes concentraciones del anticuerpo (1 – 100 nM) sobre la superficie de las proteínas e información cinética se recolectó con el tiempo. La información se ajusta usando la ecuación simultánea de ajuste global para obtener las constantes de disociación (K_D, nM) para cada Notch (Tabla 3).

Tabla 3

59R1 IgG Dissociation Constants (K_D)								
Ab	mNotch 1 (nM)	hNotch 1 (nM)	mNotch 2 (nM)	hNotch 2 (nM)*	hNotch 2 (nM)**	mNotch 3 (nM)	hNotch 3 (nM)	hNotch 4 (nM)

59R 1	>10	86.4	0.35	<0.1	<0.1	0.13	0.12	NB

*N2(EGF1-12)
**N2(EGF 10-155)

Ejemplo 3

Mapeo del epítope del anticuerpo anti-Notch2/3 59R1

Se llevó a cabo mapeo de epítopes para identificar anticuerpos que reconozcan las regiones específicas de unión de no-ligando de los dominios extracelulares del receptor Notch.

Mediante ELISA se probó la unión de los anticuerpos anti-Notch2/3 al sobrenadante de las células HEK-293 transfectadas con las secuencias que codifican para una Fc recombinante de la proteína de fusión Notch2 que comprende la longitud completa de una proteína Notch2 humana o la supresión de varios constructos de Notch2 humano que contienen varias supresiones de EGF, se repite de una a 12 veces. Ver a continuación la Tabla 4. Las células HEK-293 fueron transitoriamente transfectadas con pcDNA 3.1 (Invitrogen) con hNotch2 cDNA codificando para los aminoácidos indicados fusionados a la región a la región contante de IgG humanda (hFc). Los sobrenadantes se recolectaron 48 horas después. Primero, placas de 96 pozos se recubrieron con IgG Fc gamma específicos anti-humanos de cabra (Jackson Inmunochemicals, #109-006-098) a 100 ng por pozo en un buffer de bicarbonato de sodio a 4° de la noche a la mañana, con el fin de capturar las proteínas hN2-hfc. Las placas fueron lavadas y bloqueadas en 5% suero bovino/PBS-Tween-20. Los sobrenadantes se adicionaron a las placas y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Las placas se lavaron en PBS-T. Fab 59R1 se adicionó a 10μg/ml en 5% suero/PBS-T e incubado a temperatura ambiente por una hora. Las placas se lavaron en PBS-T. La unión del Fab fue detectada mediante anticuerpos de cabra anti-Fab humano específico conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo, # 31414) diluido 1:5000 en 5% suero/PBS T por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y desarrollaron con 1 Step Ultra TMB (Thermo, # 34028). Las placas se leyeron en un lector de placas Perkin Elmer Victor 1420. El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 se unió solamente al sobrenadante

de las células que expresan proteínas Notch2 recombinantes que comprende EGF10, lo que consiste en los aminoácidos 375-417 del Notch2 humano (Figura 3A).

Tabla 4. Constructos suprimidos de Notch2 humano

Construct	amino acids
hN2 1-3	1-144
hN2 1-4	1-181
hN2 1-5	1-221
hN2 1-6	1-263
hN2 1-7	1-301
hN2 1-8	1-341
hN2 1-9	1-378
hN2 1-10	1-417
hN2 1-11	1-456
hN2 1-12	1-493
hN2 8-12	296-493
hN2 9-12	326-493
hN2 10-12	375-493
hN2 11-12	413-493
hN2 12-12	454-493

De otra parte, el análisis FACS muestra que la unión del anticuerpo Fab 59R1 se retuvo cuando EGF11 o EGF12 fueron suprimidos de toda la longitud completa de la proteína Notch2 recombinante expresada por las células HEK 293. Mutaciones puntuales se realizaron dentro de EGF10 de la proteína de fusión Notch2 y se determinó la unión de 59R1 a cada EGF10 mutante mediante análisis FACS. Las células HEK-293 se transfectaron transitoriamente con el plásmido que expresa Notch y GFP como control de transfección. Las células positivas con GFP indicaron la expresión del transgén. El anticuerpo Fab 59R1 se adicionó a las células a 10μg/ml y se detectó mediante de cabra anti-humana PE-conjugada (Jackson Inmunochemicals).

Para verificar que la pérdida de la repetición EGF10 no interfiere con la unión al ligando se generó una mutación en hNotch2 perdiendo los aminoácidos 375-421 y se probó su unión al 59R1, al nNotch2 monoclonal 50M70 dirigido contra EGF 1-4, y unión al ligando DLL4 humano (Figura 3C). El análisis FAC de las células HEK-293 transitoriamente transfectadas con el plásmido de expresión de Notch y GFP como control de transfección. Las células positivas con GFP indicaron la expresión del transgén. Se adicionó anti – Notch2 (59M70) a 20μg /ml y detectadas mediante anti-ratón PE-conjugado de cabra (Caltag, #3004-4). El 50R1 (IgG2) se adicionó a las células a 2μg/ml y detectado mediante

anticuerpos Fc gamma específicos de cabra anti-humano PE-conjugados (Jackson Inmunochemicals). La unión al ligando se determina mediante incubación de las células con el dominio (ECD) extracelular DLL4 humano fusionado a la región constante de IgG de conejo a 5 μg/ml y detectado mediante anti-conejo PE-conjugado de burro. Como se muestra en la Figura 3C, el ligando y 59M70 se unen a hNotch2 en ausencia de EGF 10, mientras que 59R1 no lo hace.

Se realizó un análisis comparativo de las regiones EGF10 de Notch1, Notch2 y Notch 4 humanos, y de la región EGF9 de Notch 3 humano (el equivalente a EGF10 en el orden de los receptores Notch) para determinar los sitios de unión probables para 59R1 (Figura 14A). Como resultado del análisis, se crearon varias mutaciones puntuales dentro de toda la longitud de Notch2, conviertiendo los residuos dentro de EGF10 a sus correspondientes aminoácidos en el Notch1 humano. También, se realizaron mutaciones puntuales en EGF10 hNotch1 a la inversa, convirtiendo los residuos en sus correspondientes residuos hN2. Las secuencias mutantes en el Notch completo se generaron mediante mutagénesis QuikChange® (Stratagene) y verificado mediante secuenciación. La unión a los mutantes se determinó por análisis FACS (Figura 14B y 14C). El 59R1 se detectó mediante PE-conjugado de cabra anti-humano Fc gamma específico (Jack Inmunochemicals, #109-116-170). Fueron determinaron de esta forma los aminoácidos necesarios para la unión del 59R1 con hNotch 2 y son histidina 385, alanina 388, y leucina 389 (residuos empacados dentro de la scuencia hNotch mostrada en la Figura 14[a]). Los residuos correspondientes en hNotch3 son histidina 361, alanina 364 e isoleucina 365.

Ejemplo 4

El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 inhibe el señalamiento de Notch2

Los ensayos con gen reportero Luciferasa se usaron para analizar la habilidad del anticuerpo 59R1 para bloquear la señalización de Notch2 inducida por hDLL4-, hJAG1-, y hJAG2.

Las células Hela, que sobre expresan de manera estable Notch2 humano, se transfectaron transitoriamente con luciferasa de luciérnaga con un promotor sintético 8X CBS (Ong, et

al., 2006, *J. of Biological Chemistry* 281:5106-5119), pSPORT6 MAML-1, y como control de transfección luciferasa de Renilla-CV. Las células se incubaron con 100ng de hDLL4 inmovilizado (R&D systems) con los anticuerpos indicados, por 16 horas y luego analizados usando Dual-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de control se encontraba a una concentración de 40μg/ml, y luego de diluyó 1 a 4. El inhibidor de gamma secretasa (GSI), dibenzazepina (DBZ) se usó como control a 1μM. Como se muestra en la Figura 4A, se encontró que el anticuerpo 59R1 inhibe la actividad reportera de la Notch2 inducida por hDLL4.

Las células Hela, que sobre expresan de manera estable Notch2 humano, se transfectaron transitoriamente con luciferasa de luciérnaga con un promotor sintético 8X CBS, pSPORT6 MAML-1, y como control de transfección luciferasa de Renilla-CV. Las células se incubaron con 200ng de hJAG2 (R&D systems) o con hJAG2 (R&D systems) por 16 horas y luego analizados usando Dual-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo IgG2 59R1 se encontraba a una concentración de 40μg/ml. El inhibidor de gamma secretasa (GSI), dibenzazepina (DBZ) se usó como control a 1μM. Como se muestra en las Figuras 4B y 4C, se encontró que el anticuerpo 59R1 inhibe la actividad de reporte Notch2 inducida por hJAG1 y hJAG2, respectivamente.

Ejemplo 5

El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 previene del crecimiento tumoral *in vivo*

Este ejemplo describe el uso de un anticuerpo del receptor anti-Notch2/3 (59R1) que se una a una región de unión no ligando de los receptores Notch (EGF10 de Notch2 y EGF10 de Notch3) para prevenir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto.

En ciertas realizaciones, se trataron ratones NOD/SCID inyectados con 50,000 células PE13 o T3 de cáncer de mama con el anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 o el anticuerpo control 1B7.11 dos días después de las cinyecciones celulares. Los anticuerpo se dosificaron a 10mg/Kg dos veces a la semana. El anticuerpo anti-Notch2/3 50R1 redujo significativamente tanto crecimiento tumoral de PE13 (Figura 5A) como T3 (Figura 5B) comparado con el control.

Ejemplo 6

Tratamiento in vivo de tumores usando el anticuerpo anti-Notch 2/3 59R1

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti-Notch2/3 en el tratamiento de cáncer de un modelo de xenoinjerto.

En un experimento, $1x10^7$ células viables de tumor de colon Colo-205 se inyectaron en ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad inmunodeficientes *bg/un* con antecedentes Swiss CD-1. Los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño entre 65 a 200mm^3, después del cual, cada ratón se aleatorizó (n=10 por grupo experimental), y la administración de los anticuerpos comenzó. Los animales se trataron con 15mg/Kg del anticuerpo control 1B7.11 o anticuerpos anti-Notch2/3 59R1 una vez por semana. El tamaño del tumor se midió dos veces a la semana, y el volumen tumoral se calculó como está descrito (ver Michieli et al., 2004, *Cancer Cell*, 6:61-73). El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 redujo significativamente el crecimiento del tumor Colo-205 comparado con el control (Figura 5C).

En otro experimento, los anticuerpos anti-Notch2/3 59R1 fueron ensayados para determinar su efecto en crecimiento tumoral pancreático. Ratones NOD/SCID inyectados con 30,000 células PN4 de tumor pancreático, vía sub cutánea en el flanco derecho, y los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron un volumen promedio de 100mm^3. Los ratones se aleatorizaron y la dosificación de los anticuerpos anti-Notch2/3 59R1m o del anticuerpo control 1D711, comenzó. Los anticuerpos se dosificaron a 15mg/Kg y administrados una vez por semana. El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 redujo significativamente el crecimiento del tumor PN-4 comparado con el control (Figura 5D).

En un experimento adicional, los anticuerpos anti-Notch2/3 59R1 fueron evaluados para un efecto en el crecimiento del tumor de seno. Ratones NOD/SCID inyectados con 50,000 células PE13 o T3 de tumor en seno, y los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron un volumen entre 65 y 200mm^3, después de lo cual, los ratones se aleatorizaron (n=1|0 por grupo experimental), y la administración de los anticuerpos comenzó. Los animales se

trataron con 15mg/Kg dos veces por semana, sea del anticuerpo 1B7.11 o el anticuerpo anti-Notch2/3 59R1. El tamaño del tumor se midió dos veces a la semana, y el volumen tumoral se calculó como está descrito (ver Michieli et al., 2004, *Cancer Cell*, 6:61-73). El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 redujo significativamente el crecimiento de los tumores PE13 (Figura 5E) y TE (Figura 5F) comparado con el control.

Al final del tratamiento con anticuerpos, los tumores se podían recolectar para un análisis posterior. En ciertas realizaciones, una porción del tumor es analizado mediante inmunofluorescencia para valorar la penetración del anticuerpo dentro del tumor y la respuesta tumoral. Una porción fresca de cada tumor recolectado de los ratones tratados con el anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 y el anticuerpo control, se congela en nitrógeno líquido, embebidos en O.C.T, y cortados en un criostato en secciones de 10μm en láminas de vidrio. Alternativamente una porción de cada tumor se fija con formalina, se embebe en parafina, y se corta con un micrótomo en secciones de 10μm en láminas de vidrio. Las secciones se fijan posteriormente y se incuban con anticuerpos con cromóforos etiquedados que reconocen específicamente los anticuerpos inyectados para detectar el anticuerpo anti-Notch2/3 o anticuerpos control presentes en una biopsia del tumor. Por otra parte, los anticuerpo que detectan diferentes tumores y tipos de células reclutadas por tumores como, por ejemplo, anticuerpos anti-VE cadherina (CD144) o anti-PECAM-1 (CD31) para detectar células vasculares endoteliales, anticuerpos anti-alfa actina del músculo liso detectan células vasculares del músculo liso, anticuerpos anti-Ki67 para detectar células proliferativas, ensayo TUNEL para detectar células agonizantes, y anticuerpos anti-fragmentos Notch del dominio intracelular (ICD) que detectan señalización Notch, pueden ser usados para valorar si el tratamiento con el anticuerpo afecta la angiogénesis, crecimiento y morfología tumoral.

También puede ser valorado el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-Notch2/3 en la expresión génica de células tumorales. El RNA total se extrae de una porción de cada tumor recolectado de los ratones tratados con el anticuerpo anti-Notch2/3 o con el anticuerpo control, y son usados para RT-PCR cuantitativo. Se analizan parámetros como los niveles de expresión de Notch2/3, los componentes de la vía de señalización del Notch2 y/o Notch3, así como marcadores de células madre de cáncer, incluyendo, por ejemplo,

CD44 relacionados con el gen doméstico GAPDH como control interno. Por lo tanto, se determinan cambios en la expresión génica de células tumorales con el tratamiento de anticuerpos anti-Notch2/3.

Adicionalmente, el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-Notch2/3 en presencia de células cancerígenas madre en un tumor puede ser valorado. Muestras tumorales de ratones tratados con anticuerpo Notch2/3 versus anticuerpo de control se cortan en pequeños pedazos, molido completamente usando hojas esterilizadas, y se obtienen suspensiones de células individuales mediante digestión enzimática y disrupción mecánica. Luego, las células tumorales disociadas son analizadas mediante análisis FACS para determinar la presencia de células madre cancerígenas tumorigénicas basado en los marcadores celulares de superficie ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin, como se describe en detalle a continuación. Puede ser evaluada la tumorigenicidad de células aisladas sobre la base de la expresión de ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin, seguido al tratamiento con el anticuerpo anti-Notch2/3. En un ejemplo, 5,000, 1,000, 500 y 100 células madre cancerígenas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin aisladas a partir de ratones tratados con anticuerpo Notch2/3 versos anticuerpo control, se re-inyectan subcutáneamente en las depósitos grasos mamarios de ratones NOC/SCID. Se determina entonces la tumorigenicidad de las células madre cancerígenas que se basa en el número requerido de células inyectadas para la formación consistente de un tumor.

Ejemplo 7

El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 retrasa la recurrencia del tumor *in vivo* seguido por tratamiento con paclitaxel

Se inyectan subcutáneamente células de cáncer de mama (50,000 células por ratón) en la almohadilla de grasa mamaria de ratones NOD-SCID. Los tumores se dejan crecer por 50 días hasta que han alcanzado un volumen promedio de ~100mm^3. Los animales se aleatorizan (n=10/grupo) y los tratamientos se inician. Un grupo recibe anticuerpo control (1B711) a 10mg/Kg dos veces a la semana y placlitaxel (Taxol) a 15mg/Kg dos veces por semana. El volumen de los tumores se mide en los días indicados. Los tratamientos se llevan a cabo por 38 días hasta que el volumen de los tumores ha tenido una regresión a

~50mm^3, después de la cual los tratamientos con paclitaxel fueron detenidos y los tratamientos con el anticuerpo continuaron mientras la duración del experimento.

Los resultados se muetran en la Figura 6. Se observó que los tumores recurren más rápidamente en el grupo de control que en el grupo tratado con 59R1.

Ejemplo 8

El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 disminuye la frecuencia de células madre cancerígenas en un tumor *in vivo*

La limitación de los ensayos de dilución (LDAs) se puede usar para evaluar el efecto de un agente que se une a Notch en células madre cancerígenas de tumor sólido y en la tumorigenicidad de un tumor comprendiendo las células madre cancerígenas. Los ensayos pueden ser usados para determinar la frecuencia de células madre cancerígenas en tumores de animales tratados con un agente que se une a Notch u otro agente y para comparar aquella frecuencia de la frecuencia de células madre cancerígenas en tumores de animales control.

Un LDA se usó para evaluar el efecto en la tumorigenicidad de tumores de mama B51 que fueron tratados con la combinación anticuerpo control (1B711) y paclitaxel (Taxol) o tratados con la combinación de 59R1 y paclitaxel, como se describe anteriormente en el Ejemplo 7. Adicionalmente, se determina con LDA el efecto del tratamiento con el anticuerpo solo o 59R1 solo en los tumores de mama B51. Las dosis de los anticuerpos y paclitaxel y el cronograma de dosificación para el grupo con el anticuerpo control y el 59R1 fueron las mismas que se describieron en el ejemplo 7 para los otros dos grupos de tratamiento. Luego de tres dosis de anticuerpos y/o paclitaxel, los tumores fueron recolectados, procesados y disociados en células individuales. Se aislaron las células tumorales humanas de las células tumorales del xenoinjerto mediante incubación con anticuerpos biotinilados de ratón (dilución α-CD45 de ratón-biotina 1:200 y dilución rata αH2Kd ratón-biotina 1:100, BioLegen, San Diego, California) en hielo durante 30 minutos, seguido por la adición de estreptavidina marcada con perlas magnéticas y la remoción de las células de ratón con la ayuda de un imán. Las células humanas en la suspensión fueron recolectadas y contadas.

Una valoración en serie de células (30, 90, 370 y 810 células) de cada uno de los cuatro ghrupos de tratamiento fue inyectada en una mezcla 1:1 de buffer FACS y Matrigel en un nuevo se de ratones NOD-SCID (n=10/grupo). Los tumores se dejaron crecer por 72 días. El porcentaje de ratones con tumores detectables se determinó en todos los grupos. Se calculó la frecuencia de las células madre cancerígenas usando el software L-Calc® (StemCell Technologies Inc.; descargable de www.stemcell.com/search/default.asp).

Los resultados se muestran en la figura 7. Se determinó la frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor de los ratones tratados con el control ("Control") siendo 1:66. Se mostró que la frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor de los ratones tratados con paclitaxel ("Tazol") fue 1:25, indicando que el tratamiento con paclitaxel había, de hecho, incrementado la frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor más de dos veces con respecto al control.

Por el contrario, el tratamiento con el anticuerpo 59R1, sea este solo ("59R1") o en combinación con paclitaxel ("Taxol+59R1"), redujo la frecuencia de células madre cancerígenas en los tumores. El anticuerpo 59R1 solo redujo la frecuencia de células madre cancerígenas en tumores de mama más de dos veces con respecto al control. El tratamiento con la combinación del anticuerpo 59R1 y paclitaxel redujo la frecuencia de células madre cancerígenas en el tumor más de dos veces respecto al tratamiento con 59R1 solamente ($p<0.0001$), 4.5 veces con respecto al tratamiento con el anticuerpo control, y 12 veces respecto al tratamiento con paclitaxel solamente. Estos resultados indican que el tratamiento con el anticuerpo 59R1 es efectivo en la reducción de la tumorigenicidad del tumor de mama, sea este solo o en combinación con paclitaxel, a pesar de que el tratamiento con paclitaxel solo tiene el efecto opuesto.

Ejemplo 9

Tratamientos de tumores in vivo adicionales usando el anticuerpo anti-Notch2/3 59R1

Se inyectaron subcutáneamente células tumorales pancreáticas PN4 (50,000 células por ratón) en el costado de los ratones Nod-Scid. Los tumores se dejaron crecer por 27 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de ~120mm^3. Los animales se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento (n=10/grupo) y se iniciaron los tratamientos. Un grupo

recibió anticuerpo control (1B711) a 10mg/Kg dos veces por semana; un grupo recibió gemcitabina a 40mg/Kg una vez por semana más el anticuerpo de control a 10mg/Kg dos veces por semana; un grupo recibió 59R1 a 10mg/Kg dos veces por semana; y el cuarto grupo recibió la combinación de 59R1 a 10mg/Kg dos veces por semana y gemcitabina a 40mg/Kg una vez por semana. El volumen de los tumores se midió en los días indicados. Los resultados se muestran en la Figura 8. Se encontró que el crecimiento tumoral se inhibe por la combinación de 59R1 y gemcitabina ($p<0.001$).

Se inyectaron subcutáneamente células tumorales de melanoma M4 (10,000 células por ratón) en el costado de los ratones NOD-SCID. Los tumores se dejaron crecer por 25 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de ~80mm^3. Los animales se aleatorizaron en grupos de tratamiento (n=10/grupo) y se iniciaron los tratamientos. Un grupo recibió anticuerpo control (1B711) a 10mg/kg dos veces por semana y un grupo recibió 59R1 a 10mg/Kg dos veces por semana El volumen de los tumores se midió en los días indicados. Los resultados se muestran en la Figura 9. Se encontró que el crecimiento tumoral se inhibe por 59R1.

Se inyectaron subcutáneamente células tumorales del colon C28 (10,000 células por ratón) en el costado de los ratones Nod-Scid. Los tumores se dejaron crecer por 24 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de ~130mm^3. Los animales se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento (n=10/grupo) y se iniciaron los tratamientos. Un grupo recibió anticuerpo control (1B711) a 10mg/Kg dos veces por semana; un grupo recibió irinotecán a 7.5mg/Kg una vez por semana más el anticuerpo de control a 10mg/Kg dos veces por semana; un grupo recibió 59R1 a 10mg/Kg dos veces por semana; y el cuarto grupo recibió la combinación de 59R1 a 10mg/Kg dos veces por semana e irinotecan a 7.5mg/Kg una vez por semana. El volumen de los tumores se midió en los días indicados. Los resultados se muestran en la Figura 10. Se encontró que el crecimiento tumoral se inhibe por 59R1 con respecto al grupo del anticuerpo control y por la combinación de 59R1 e irinotecan con respecto al grupo de irinotecan..

El Anticuerpo IgG2 59R1 también se probó en las líneas del xenoinjerto de tumor de mama *in vivo* OMP-B34, OMP-B39, OMP-B44, PE13 y UMT1, la línea de xenoinjerto de tumor pancreático OMP-PN8, y la línea de xenoinjerto de tumor del colon OMP.C8. Estas líneas de xenoinjertos tumorales se establecieron mediante la adhesión a los procedimientos descritos en Al-Hajj et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:3983-3988. Se usaron ratones hembra inmunocomprometidos NOD/SCID de 7 a 10 semanas de edad para el establecimiento de los xenoinjertos de tumor de mama, y se usaron ratones machos NOC/SCID para los modelos tumorales OMP-Pn8 y OMP-C8 (Harlan, Indianapolis, Indiana). El anticuerpo IgG2 59R1 también se evaluó *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de tumor de colon Colo-205. Se usaron ratones hembra inmunodeficientes *bg/un XID* con antecedentes Swiss CD-1 para el modelo de xenoinjerto de tumor de colon Colo-205. En el caso de modelos de cáncer de mama, se tienen que implantar pellets de estrógeno de lenta liberación (0,36mg). Los ratones se inyectaron subcutáneamente en el flanco derecho con 50,000 (OMP-B34, OMP-B39, OMP-B44, PE13, and UM-T1) o $1x10^7$ (Colo-205) células viables, respectivamente, en una mezcla con PBS (sin magnesio o calcio) y Matrigela en una proporción1:1. El volumen total inyectado por ratón fue de 200µl siendo el 50% Matrigel. Los ratones se aleatorizaron una vez el tumos a alcanzado un tamaño entre 65-200mm^3. Los anticuerpos se administraron semanalmente y los tumores se midieron dos veces por semana. Como anticuerpo control se utiliza LZ1 (un anticuerpo humano que reconoce lisozima) o 1B711 (un anticuerpo IgG1 murino que reconoce el hapteno trinitrofenol) para el tratamiento de cada tipo de tumor. El volumen del tumor se calculó como se describe en Al-Hajj et al. (2003). La información se expresa como el promedio y el promedio ± S.E.M. Los promedio de los grupos se compraraon usando el la prueba t de Student de dos colas desapareados. Los valores de probabilidad (P) de <0.05 se interpretan como significativamente diferente. Todo el análisis estadístico se realizó usando Microsoft EXCEL y Graph Pad PRISM.

Los resultados de los experimentos adicionales *in vivo* en los modelos de xenoinjerto Colo205, C8, PNA, B34, B39, B44, PE13, y T1 se muestra en las Figuras 11A-11H, respectivamente. Como se muestra en la Figura 11[a], la monoterapia con el anticuerpo 59R1 inhibió significativamente el crecimiento del tumor Colo205 con respecto al anticuerpo control (LZ1) ($p<0.01$). La terapia combinada de 59R1 más el anticuerpo antiVEGF

bevacizumab (AVSTIN) proporciona una inhibición aún mayor del crecimiento tumoral ($p<0.001$) que el 59R1 o el bevacizumab solos. En otro modelo de xenoinjerto colorectal, C8, 59R1 mostró de la misma forma inhibir el crecimiento tumoral con respecto al anticuerpo de control LZ1 (Figura 11B). De forma similar, se encontró que el 59R1 inhibe el crecimiento del tumor pancreático (con respecto al anticuerpo control) en el modelo de xenoinjerto PN8 (Figura C). También se mostró que el 59R1 inhibe el crecimiento del cáncer de mama con respecto al anticuerpo control en cada uno de los modelos de xenoinjerto de cáncer de mama: B34 (Figura 11D), B39 (Figura 11E), B44 (Figura 11F), y PE13 (Figura 11G). Se encontró que el anticuerpo 59R1 fue de la misma forma, efectivo al inhibir el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de mama T1 (Figura 11H), sin embargo, fue efectivo solamente en presencia de estrógeno, a pesar de que T1 es un tumor con receptor de estrógeno negativo.

Ejemplo 10

Efecto del tratamiento con anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 en la regulación génica en los modelos de xenoinjertos tumorales

Los niveles de expresión génica en varios de los modelos de xenoinjertos tumorales que se trataron con el anticuerpo IgG2 59R1 se analizaron mediante un microensayo. El análisis de perfiles de expresión génica global se realizó en el microensayo Affymetrix HG-U133 plus 2.0 (affimetrix, Santa Clara, California). Se aislaron tres muestras de RNA independiente de todos los xenoinjertos de tumores de los grupos de tratamiento y control y fueron hibridizados a los microensayos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó un ajuste al escaneo del historial de la matriz y la normalización de la intensidad de la señal con el agoritmo GCRMA en el software de códifo abierto bioconductor. (www.bioconductor.org). El nivel de expresión de cada gen fue normalizado mediante una transformación al valor z a través de las muestras en los grupos de control (CTRL) y tratamiento (59R1). Los genes expresados diferencialmente ($p<0.05$ y veces de cambio > 2.0) entre los dos grupos se identificaron con el t-test Bayesian (Baldi et al., 2001, *Bioinformatics*, 17:509-519. Los patrones de expresión de los genes regulados diferencialmente asociados seleccionados en los modelos de xenoinjerto tumoral (Colo205,

B44, PE13 y T1) se muestran en la Tabla 5 abajo. El valor P (Pval) de cada gen es la probabilidad de regulación significativa del gen mediante el 59R1, por casualidad a través del t-test Bayesian. Un número de genes incluyendo los genes que codifican para la regulación de la señalización 5 de proteína G (RGS5), Notch3, y la proteína proteína tipo *hairy/enhancer-of-split related* con motivo tipo YRPW (HEYL) mostraron ser bajamente reguladas en el estroma del ratón tratado con 59R1 con respecto al ratón control. (En contraste, estos genes particulares que codifican para RGS5, Notch3 y HEYL no se encontraron que bfueran bajamente controladas en las células humanas de los tumores).

Tabla 5. Genes expresados diferencialmente en e estroma de tumores tratados con 59R1

	Colo205		B44		PE13		T1	
Gen	Veces	pVal	Veces	pVal	Veces	pVal	Veces	pVal
1420942_s_at (Rgs5)	-5.52	7.65E-07	-2.43	5.59E-04	-4.23	2.86E-05	-1.18	9.82E-04
1417466_at (Rgs5)	-3.39	6.62E-07	-2.22	3.11E-04	-4.03	1.31E-10	-1.99	4.11E-04
1420941_at (Rgs5)	-5.10	1.66E-03	-2.09	1.18E-03	-2.99	1.35E-05	-1.97	2.07E-03
1421964_at (Notch3)	-3.26	3.70E-06	-2.03	2.30E-03	-1.91	1.67E-03	-1.01	8.86E-01
1416286_at (Rgs4)	-3.08	2.69E-03	-1.57	3.84E-02	-1.83	6.71E-05	-1.13	4.47E-01
1434141_at (Gucy1a3)	-2.49	2.87E-03	-1.74	1.07E-02	-4.18	1.49E-07	1.20	5.95E-01
1459713_s_at (Tmem16a)	-1.90	1.90E-03	-1.70	1.01E-02	-7.28	9.89E-10	-2.14	1.79E-04
1420872_at (Gucy1b3)	-1.94	1.90E-02	-1.65	7.68E-03	-3.06	8.52E-10	-1.01	7.13E-01
1422789_at (Aldh1a2)	-1.73	1.20E-02	-4.92	2.42E-08	-2.17	1.58E-04	-2.16	9.27E-04
1419302_at (Heyl)	-3.28	5.61E-03	-1.12	2.36E-01	-1.77	5.72E-04	-1.07	2.39E-02
1451501_a_at (Ghr)	-1.83	1.69E-02	-2.24	2.71E-04	-1.66	8.90E-04	-1.12	3.38E-01
1417714_x_at (Hba-a1/Hba-a2)	-8.37	2.49E-02	-2.56	4.63E-04	-1.92	1.06E-02	1.42	9.24E-01
1428361_x_at (Hba-a1/Hba-a2)	-8.91	1.93E-02	-2.42	1.08E-03	-1.73	4.27E-02	1.73	4.67E-01
1452590_a_at (Plac9)	-1.61	1.07E-02	-1.64	1.22E-02	-1.62	6.17E-03	1.20	7.36E-01

1449632_s_at (Fkbp10)	-1.72	1.69E-02	-1.57	1.12E-02	-1.63	1.80E-04	1.07	5.97E-01
1449280_at (Esm1)	2.07	1.06E-02	1.55	3.48E-02	1.56	4.35E-02	1.18	2.44E-01
1418829_a_at (Eno2)	1.79	2.92E-02	1.71	1.02E-02	1.54	5.43E-03	1.29	9.92E-02

Los niveles de expresión en el estroma de los modelos de xenoinjerto Colo205, B29, B34, B44, Pe13, T1 (sin el tratamiento con estrógeno), T1 (con el tratamiento con estrógenos), C8 y PN8 se los genes seleccionados se han identificado en el análisis de microensayo como regulado por el tratamiento con 59R1 (*heyl*, *notch3*, *rgs5*, *angpt1*, y *angpt2*) se analizaron posteriormente mediante el análisis TaqMan®. Los resultados se muestran en las Figuras 12A (*heyl*), 12B (*notch3*), 12C (*rgs5*), 12D (*angpt1*), y 12E (*angpt2*).

Los resultado del análisis TaqMan® cofirmaron que *notch3* y *rgs5* son bajamente regulados en el estroma de cada uno de los varios tipos de tumores en respuesta al tratamiento con 59R1 (con respecto al control) (figuras 12B y C). El RGS5 es un bien conocido marcador de pericitos y células del músculo liso (Berger et al., 2005, *Blood*, 105:1094-1101; Lovschall et al., 2007, *Int. J. Dev. Biol.*, 51: 715-721; Cho et al., 2003, *FASEB J.*, 17:440-2). Se ha identificado que el Notch3 es co-expresado con RGS5 en pericitos durante la angiogénesis y juega un papel imporante en la regulación del destino de los pericitos y las células del músculo liso (Lovschall, 2007, *Int. J. Dev. Biol.*, 51: 715-721; Domenga et al., 2004, *Genes & Dev.*, 18:2730-2735; Sweeney et al., 2004, *FASEB J.*, 18:1421-3; Morrow et al., 2005, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 289:C1188-C1196).

Adicionalmente, se confirmó también que *heyl* es poco regulado en el estroma de cada uno de los modelos de xenoinjerto, excepto B34 (Figura 12A). El HeyL pertenece a la familia Hey de factores de transcripción corriente abajo de la señalización de Notch con la corriente (Hey1, Hey2 y Hey3). La baja regulación del *heyl* hecha por el 59R1 sugiere que el anticuerpo 59R1 afecta directamente la señalización de Notch mediante la baja regulación de *heyl*.

Se determinó que la *Angiopoietina-1* (*angpt1*) y *angiopoietina-2* (*angpt2*) también son reguladas en el estroma de un gran número de modelos de xenoinjertos de cáncer de mama (Figuras 12D y E). ANGPT1 y ANGPT2 (angiopoietina-1 y -2) son ligandos de los

receptores TIE 1 y 2. Los receptores TIE, como el VEGF, son moleculas señalizadoras cruciales en los procesos de neoangiogénesis (Jones et al., 2001, *Nature Reviews*, 2:257-267).

Particularmente, no obstante que *angpt1* y *angpt2* fueron reguladas en el estroma del modelo T1 cuando se usó estrógeno ("T1 e"), las condiciones bajo las cuales el tratamiento con 59R1 fue efectivo contra el crecimiento tumoral, pero no en el estroma del mismo modelo en ausencia del tratamiento con estrógeno ("T1 ne"), condiciones bajo las cuales el tratamiento con 59R1 fue inefectivo contra el crecimiento tumoral (ver Ejemplo 9, arriba). Por lo tanto, el efecto del 59R1 en la regulación de la angiopoietina-1 y la angiopoietina-2 en el estroma del tumor T1 abolido en la ausencia del tratamiento con estrógeno. Una posible explicación de este efecto es que en ausencia del tratamiento con estrógeno, los niveles de los factores de crecimiento angiopoietina-1 y angiopoietina-2 en el estroma T1 no están suficientemente elevados para proporcionar disminuciones medibles en la expresión de los niveles luego del tratamiento con el anticuerpo 59R1. El estrógeno ha venido mostrando que tiene efectos significativos en el microambiente del tumor (Banka et al., 2006, *Cancer Res.* 66:3667-3672). Una posible explicación para esta información es que el estrógeno lleva a una dependencia del tumor a la señalización del ANGPT2, que a su vez lleva a sensibilidad al tratamiento con 59R1.

Ejemplo 11

El anticuerpo anti-Notch2/3 59R1 induce significativamente hipoxia en los tumores de colon y mama

La tinción de regiones hipóxicas se realizón en los tumores Colo-205 de colon y PE-13 de mama que habían sido tratados, sea con el anticuerpo IgG2 59R1 o con el anticuerpo control 11B711. La tinción se realizó como se encuentra descrito en Ridgway et al., *Nature* 444:1083-1087. De manera breve, para medir la hipoxia, se inyectó intraperitonealmente a 60mg/kg el clorhidrato de pimonidazol (HypozyProbe, NPI, Burlington, Massachusetts) 1 hora antes del sacrificio, el clorihidrato forma un aductos con proteínas de larga vida a presión de oxígeno parcial menor que aproximadamente 10mmHg. Los tumores se procesaron para análisis histológicos, y secciones de los tumores se tiñeron usando el

anticuerpo anti-pimonidazol siguiendo el ptrotocolo del fabricanete (NPI). SE tomaron fotografías usando un microscopio BX51 (Olympus, Center Valley, PA).

Las células tumorales viables se encontraron igualmente presentes en los tumores tratados con 1B711 y 59R1, como se indicó en una tinción DAPI relativamente uniforme y densa (no se muestran los datos). El número de células positivas CD31 también permaneció sin cambios, sugiriendo que el número de células endoteliales no se vio afectado por el tratamiento con 59R1. Sin embargo, en los tumores Colo-205 y PE-13 tratados con 59R1 las regiones hipóxicas fueron significativamente más pronunciadas (como se detectó mediante el anticuerpo anti-pimonidazol) que en los tumores tratados con 1B711 (no se muestran los datos). Se utilizó $F(ab')_2$ de cabra anti-conejo AF594-conjugado para detectar el anticuerpo anti-CD31 y anticuerpo de cabra anti-conejo FITC-conjugado para determinar el anticuerpo anti-pimonidazol.

Ejemplo 12

Tumores de mama que comprende supresiones en el gen supresor del tumor PTEN responden al tratamiento con 59R1

Se prepararon muestras de DNA a partir de células de xélulas tumorales de cáncer de mama. Antes del aislamiento del DNA, las células del estroma de ratón en los modelos tumorales de xenoinjerto se redujeron usando partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos específicos de células de ratón. Las muestras de DNA purificado fueron hibridizadas a Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 genechip (Affymetrix, Santa Clara, California), que tiene más de 946,000 sondas para la detección de variaciones en el número de copias (CNVs), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La copia de los cambios en los estados de los números se estimaron mediante el Modelo Hidden Markov (HMM) y sus variaciones (CNVs) para cada muestra se obtuvieron mediante análisis por segmentación de rangos usando Hapman 270 como línea base. Debido al ruido inherente del arreglo, -0.5 y -1.0 log2 radios se usaron como los puntos corte para la supresión heterocigótica y homocigótica bajo un umbral de significancia $<1.0x10^{-6}$ y un número mínimo de sondas por segmento =5.

La Figura 13 muestra el exón, la distribución de sondas Affymetrix, y las supresiones en el gen supresor tumoral homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) en el cromosoma 10. Se encontró que los tumores de mama B29, B34, B37, B40, B51, T2, T3 y T6 tenían intacto los genes PTEN en sus genomas. El gen PTEN estaba determinado a hospedar supresiones homocigóticas en el tumor B39, mientras que los tumores B44, PE13 y T1 estaban determinados a tener supresiones heterocigóticas en ese gen. Como se discutió anteriormente, se determinó que el 59R1 tenía eficacia antitumoral en cada una de los cuatro tumores de mama comprendiendo supresiones homocigóticas y heterocigóticas en el PTEN. Estos resultados sugieren que los tumores, específicamente tumores de mama, que hospedan supresiones homocigóticas o heterocigóticas del PTEN son particularmente adecuadas para el tratamiento con un anticuerpo anti-Notch2/3 como el 59R1.

Ejemplo 13

Caracterización del anticuerpo 59R5

Se identificó un anticuerpo humano adicional 59R5 que se une específicamente al Notch2 y Notch 3 humano. Las secuencias de las cadenas pesada y liviana se proporcionan en la SEQ ID NO:49 y SEQ ID NO:18, respectivamente. La región variable de la cadena pesada se proporciona en la SEQ ID NO:50 y la región variable de la cadena liviana se proporciona en la SEQ ID NO:13. La secuencia CDR3 de la cadena pesada del 59R5 comprende SIFYTT, es la SEQ ID NO:51. Las otras secuencias CDER del 59R5 son idénticas al 59R1. El análisis Biacore de las afinidades de los anticuerpo 59R1 y 59R5 indicaron que 59R5 tiene propiedades de unión similares para Notch2 y Notch3 como el 59R1. Ambos anticuerpos se unen a los receptores Norch2 y Notch 3 humanos y murinos con una afinidad en el rango nanomolar (ver Tabla 6)

Tabla 6

Constantes de Disosiación de la IgG (K_D, nM)							
	m-Notch1	h-Notch1	m-Notch2	h-Notch2	m-Notch3	h-Notch3	h-Notch4
59R1	>10	>10	0.65	0.05	0.32	0.19	NB

59R5	>10	>10	0.26	0.05	0.29	0.22	NB

Se determinó que el 59R5 tiene una actividad bloqueante de la señalización de Notch2 y Notch similar al 59R1. La activación de los receptores se determinó en ensayos basados en luciferasa. Las células tumorales PC3 fueron transitoriamente transfectadas con un receptor Notch humano o de ratón (Notch2 humano, Notch2 murino, Notch3 humano, o Notch3 murino) y un constructo GFP inducible reportero. Las células trasnfectadas fueron incubadas con diferentes concentraciones de los anticuerpos 59R1 o 59R5en la presencia de la proteína DLL4-Fc pasivamente inmovilizada. La activación del receptor Notch se determinó mediante la medición de la actividad luciferasa. Como se muestra en la Figura 15[a], el 59R5 bloquea la activación de la señalización de los receptores Notch2 humano, Notch2 murino, Notch3 humano y Notch3 murino inducida por ligando a niveles similares que el 59R1.

Se determinó el epítope de unión del 59R5. Como se describe en el Ejemplo 3 para el análisis del anticuerpo 59R1, se crearon varias mutaciones puntuales en toda la longitud del Notch1, convirtiendo los residuos dentro del EGF10 en sus aminoácidos correspondientes en el Notch2 humano. Las secuencias mutantes en toda la longitud del Notch se generaron mediante mutagénesis QuikChange® (Stratagene) y se verificaron mediante secuenciación. Células HEK 293 se transfectaron transitoriamente con vectores de expresión que codifican para Notch2 humano, Notch1 humano o, los residuos 382-386 mutaron a sus correspondientes residuos Notch2 humanos. Las células fueron co.trasnfectadas también con un plásmido que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) para marcar aquellas céulas que recibieron el plásmido trasnfectado. Las células se incubaron con 59R1, 59R5 y el anticuerpo fluorescente secundario, y posteriormente examinadas mediante FACS. Se detectaron 59R1 y 59R5 mediante anticuerpos Fc gamma específicos de cabra anti-humano PE-conjugados (Jackson Inmunochemicals, #109-116-170). Como se muestra en la figura 15B, el anticuerpo 59R5 se une a Notch2 y no se une a Notch1. Sine embargo, cuando los aminoácidos correspondientes al Notch2 385-389 con sustituidos en Notch1, el anticuerpo 59R5 fue capaz de unirse al Notch1 mutado. Estos sugiere que, por lo menos uno o más aminoácidos necesarios para la unión de 59R5 al Notch2 humano se encontraban ubicados dentro de los aminoácidos 385-389 (residues in the boxed hNotch2

sequence Figura 14A) y sugiere que el 59R5 se une al mismo epítope que el 50R1, o un epítope similiar a este, o se superpone con el epítope de 59R1.

Ejemplo 14

Tratamiento de tumores *in vivo* usando el anticuerpo Notch2/3 59R5

En una realización, se inyectaron ratones NOC/SCID con células de tumor de mama PE13. Los ratones fueron tratados con anticuerpo anti-Notch 2/3 59R1, anticuerpo anti-Notch2/3 59R5, o el anticuerpo control. Los anticuerpos se dosificaron a 15mg/kg una vez por semana, en una modalidad "preventiva" en donde la dosificación inició dos días después de la inyección. La Figura 16A muestra que el tratamiento con 59R5inhibicó el crecimiento tumoral en más de un 80%, similar a los efectos observados con 59R1.

En otra realización, se inyectaron ratones NOC/SCID con células tumorales de tumor de colon C28. Los ratones fueron tratados con anticuerpo anti-Notch 2/3 59R1, anticuerpo anti-Notch2/3 59R5, o el anticuerpo control. Los anticuerpos se dosificaron a 15mg/kg una vez por semana, en una modalidad "preventiva" en donde la dosificación inició dos días después de la inyección. La Figura 16B muestra que tanto 59R5 como 59R1 inhiben el crecimiento de tumores de colon C28.

En otra realización, se inyectaron ratones NOC/SCID con células de tumor de colon Co205. Los ratones fueron tratados con anticuerpo anti-Notch 2/3 59R1, anticuerpo anti-Notch2/3 59R5, o el anticuerpo control. Los anticuerpos se dosificaron a 15mg/kg una vez por semana luego de que los tumores se establecieron. La Figura 16A muestra que tanto 59R5 como 59R1 inhiben el crecimiento de tumores de colon C28en niveles similares.

Ejemplo 15

Tratamiento *in vivo* de tumores usando el anticuerpo Notch2/3 59R5 en un tratamiento combinado

En una realización, se inyectaron ratones NOC/SCID con células de tumor pancreático PN8. Los tumores se dejaron crecer por aproximadamente 33 días hasta que alcanzaran un volumen promedio de 150mm^3. Los ratones fueron tratados con gemcitabina a 20mg/kg

una vez por semana por cuatro semanas en combinación con el anticuerpo control, anticuerpo anti-Notch 2/3 59R1, o anticuerpo anti-Notch2/3 59R5. Como se muestra en la Figura 17A, el anticuerpo 59R5 inhibió el crecimientumoral en un nivel similar al anticuerpo 59R1 y el tratamiento de combinación recurrente prolongado fue mayor que la gemcitabina solamente.

En una realización, con el fin de evaluar el efecto del 59R5 en las células madre cancerígenas, se llevó a cabo un estudio de recurrencia tumoral en el modelo de tumor de mama PE13. Se inyectaron ratones NOC/SCID con células de tumor de mama PE13. Los tumores se dejaron crecer por aproximadamente 40 días antes de que los tratamientos comenzaran. Los ratones fueron tratados con taxol a 15mg/kg dos veces por semana por cinco semanas en combinación con el anticuerpo control o con el anticuerpo anti-Notch2/3 59R5. Se observó que el 59R5 demora significativamente la recurrencia del tumor luego de un tratamiento con unas dosis altas de taxol (Figura 17B). Estos resputaldos sugieren que el tratamiento con 59R5 reduce la frecuencia de células madre cancerígenas.

En la Tabla 7 se muestra un resumen de la actividad *in vivo* de 59T1 y 59R5 como se describió en las realizaciones anteriores. Los volúmenes tumorales y los valores para cada experimento se muestran con relación al grupo control. Los estudios PE13, C28 y Colo205 se llevaron a cabo como se describe en el Ejmplo 14. Los estudios PN8 se llevaron a cabo como se describió anteriormente. Para el experimento PN8, el control es gemcitabina sola y los valores para 59R1 y 59R5 con las combinaciones con gemcitabina. Los anticuerpos se dosificaron una vez por semana a 15mh/kg para todos los experimentos.

Tabla 7

	PE13		**C28**		**Colo205**		**PN8**	
	Tumor vol	p value	Tumor vol	p value	Tumor vol	p value	Tumor vol	p value
59R1	0.25	<0.0001	0.29	<0.0001	0.68	0.003	0.27	0.026
59R5	0.18	<0.0001	0.38	<0.0001	0.61	0.001	0.11	0.036

Ejemplo 16

Regulación de la expresión génica en tumores luego del tratamiento con 59R5

Se examinó la expresión de genes objetivo clave en células tumorales y el estroma tumoral para determinar si 59R1 y 59R5 estaban funcionando mediante el mismo mecanismo *in vivo*. La expresión génica se valoró mediante PCR cuantitativo en células tumorales PE13 y del estroma. Los niveles de expresión génica relacionados con el grupo tratado con el anticupero control se muestran en la Figura 18. Tanto 59R1 como 59R5 regulan la expresión de HeyL murino, Notch3 y RGS5 en células del estroma en una misma medida (panel izquierdo). El mismo patrón de regulación se observó en tumores C28 (no se muestran los datos). Así, el mecanismo de acción previamente identificado para el 59R1 fue retenido por 59 R5, en la regulación genética en el tumor estromal es crítico para el funcionamiento de la vasculatura y pericitos. De forma similar, 59R1 y 59R5 regulan la expresión de los genes humanos ID4, EDNRA y EGLN3 en células tumorales en un mismo nivel (panel derecho).

A diferencia de otros miembros de esta familia de genes, el ID4 es generalmente poco expresado en tumores, se ha mostrado que es un supresor tumoral en cáncer de mama que es frecuentemente silenciado mediante metilación. La pérdida de la expresión de ID4 se correlaciona con un peor diagnóstico en los pacientes con cáncer de mama (Noetzel et al., 2008, *BMC Cancer* 8:154). Por lo tanto, la sobre regulación del ID4 en las células tumorales PE13 puede ser parte del mecanismo anti-tumoral del anti-Notch2/3. El EDNRA es el gen que codifica para el receptor de endotelina que promueve el crecimiento tanto de células endoteliales como tumorales y estimula la actividad metastásica de las células tumorales (Bagnato and Rosano 2008, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40:1443-51). El EGLN3 (también conocido como HIF-3α) es un gen que induce la hipoxia. La inducción de EGLN3 por el anti-Notch2/3 es consistente con la disrupción de la vasculatura funcional en los tumores tratados. Esta información indica que las actividades biológicas y el mecanismo de acción tanto de 59R1 como de 59R5 son muy similares.

La Tabla 8 muestra los resultados del análisis de un microensayo de 59R1 y 59R5 tratando tumores PE13. Los números son los valores promedio de la expresión diferencial para animales tratados vs. animales control, con 3 animales por grupo.

Tabla 8

59R1		**59R5**			
veces	**pVal**	**veces**	**pVal**	**Símbolo**	**Nombre del Gen**
-5.10	3.21E-05	-3.00	1.10E-03	Foxc2	forkhead box C2

-4.40	1.26E-05	-2.46	7.45E-04	Hey2 with	hairy/enhancer-of-split related YRPW motif 2
-4.32	8.03E-06	-2.14	1.00E-04	Rgs5	regulator of G-protein signaling 5
-3.33	5.59E-04	-2.79	3.18E-03	Heyl with	hairy/enhancer-of-split related YRPW motif-like
-2.71	4.80E-04	-2.90	1.02E-04	Rgs4	regulator of G-protein signaling 4
-2.10	2.17E-04	-1.86	4.33E-05	Notch3 (Drosophila)	Notch gene homolog 3
-1.92	3.16E-02	-2.35	3.43E-03	Mmp9	matrix metallopeptidase 9
2.36	3.06E-02	4.97	3.35E-02	Pdcd1lg2	programmed cell death 1 ligand 2
7.42	6.25E-07	2.80	2.07E-03	Gzma	granzyme A

El análisis del microensayo revela que el 59R5 inhibe significativamente la vía Notch ($p<0.01$) como se midió mediante expresión génica (e.g., *Foxc2, Hey2, Heyl, Notch3*). Estos resultados fueron comparables al 59R1. Genes adicionales involucrados en la apoptosis (e.g., granzyme A) y remodelador de tejido asociado al tumor (MMP-9) también se expresaron similarmente ente 59R1 y 59R5. Esta información sugiere que la actividad biológica y el mecanismo de acción tanto de 59R1 como de 59R5 son muy similares.

Ejemplo 17

Producción de anticuerpos Notch2 y/o Notch3 adicionales

Producción de antígenos

En ciertas realizaciones, fragmentos polipéptidos recombinante del dominio extracelular de Notch2 humano o Notch3 humano se generan como antígenos para la producción de anticuerpos. Por ejemplo, la tecnología de DNA recombinante estándar se puede usar para aislar un polinucleótido que codifica para los aminoácidos 1-493 del Notch2 (SEQ ID NO: 33), que abarca EGF1-12. Este polinucleótido puede estar ligado en la fracción N-terminal tanto de un Fc-tag humano o un hidtidina-tag y clonarse en un plásmido vector de transferencia para el baculovirus mediando su expresión en células de insecto. Los protocolos de transfección estándar, infección y cultivo de células pueden ser usados en la producción de células de insecto que expresen el polipetido Notch2 correspondiente (SEQ ID NO:4) (O'Reilly et al., 1994, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press).

La escisión de la señal de secuencia endógena del Notch2 humano se aproximó usando el software de predicción de la escisión SignalP 3.0, sin embargo el punto de escisión actual *in vivo* puede diferir por un par de aminoácidos de una u otra dirección. La escisión predicha del Notch 2 es entre los aminoácidos 1 y 26, por lo tanto, la proteína antígeno Notch2 comprende aproximadamente del aminoácido 27 hasta el aminoácido 493. La proteína antígeno puede ser purificada a partir del medio condicionado de la célula de insecto usando Proteína A y cromatografía de afinidad Ni^{++}-quelato. Luego, la proteína antígeno purificada se dializa contra PBS (pH=7), se concentra a aproximadamente 1mg/ml, y se realiza una filtración esterilizante para prepararla para inmunización.

Inmunización

Los ratones pueden ser inmunizados con proteína antígeno Notch2 o Notch3 purificada usando técnicas estándar. La sangre de cada ratón se puede analizar para reconocimiento del antígeno usando ELISA y análisis FACS aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial (descrito en detalle más abajo). Los animales con el los títulos más alto del anticuerpo se seleccionan para aumentar por última vez el antígeno luego de lo cual las células del vaso son aisladas para producción de hibridomas. Las células de hibridomas son colocadas 1 célula por pozo en plazas de 96 pozos, y el sobrenadante de cada pozo se analiza mediante ELISA y análisis FACS contra la proteína antígeno. Varios hibridomas con un alto título de anticuerpo se seleccionan y escalan en un frasco estático de cultivo. Los anticuerpo se purifican del sobrenandante del hibridoma usando cromatografía de proteína A o proteína G agarosa y los anticuerpos son probados mediante FACS como se describe a continuación.

Análisis FACS

Para seleccionar los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas y los clones que reconocen la superficie de las células nativas de la proteína Notch2 (y/o Notch3) se usa el análisis FACS. Las células HEK293 son co-tansfectadas con factores de expresión que codifican para un toda la longitud del clon CDNA del Notch2 y el marcador de transfección GFP. 24 a 48 horas luego de la trasnfección, las células se colectan en suspensión y se incuban en hielo junto con el anticuerpo anti-Notch2 (o anti-Notch3 o anti-Notch2/3). O

IgG control con el fin de detectar unión al anticuerpo de fondo. Las células se lavan y se detectan anticuerpos primarios con anticuerpo anti-ratón secundarios conjugado a un cromóforo fluorescente. Las células marcadas son luego ordenadas por FACS para identificar anticuerpos anti-Notch2, anto-Notch 3 y antoNotch2/3 que reconocen específicamente la expresión de la superficie celular de la superficie nativa de las células de las proteínas Notch2 y/o Notch3.

Anticuerpos quiméricos

Luego de que se identifican los anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el dominio de no unión del receptor Notch, estos anticuerpos se modifican para superar lla respuesta inmune contra el anticuerpo anti-ratón (HAMA) cuando los anticuerpos del ratón se usan como agente terapéutico. Las regiones variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo monoclonal seleccionado se aíslan mediante RT-PCR a partir de las células de hibridoma y se ligan dentro del marco de la cadena pesada de la IgG1 humana y de la cadena liviana de las regiones constantes kappa, respectivamente, en los vectores de expresión de mamíferos. Alternativamente, es usado un vector de expresión de Ig humano como el TCAE 5.3 que contiene los genes de la cadena pesada de la IgG humana y la cadena liviana de las regiones constantes kappa en el mismo plásmido (Preston et al., 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42). La expresión de vectores que codifican para cadenas pesadas y livianas quiméricas son luego co-transfectadas en células de ovario de Hámster Chino (CHO) para producción quimérica de anticuerpos. La inmunoreactividad y afinidad de los anticuerpos quiméricos se comparan con los anticuerpos murínicos madre mediante ELISA y FACS.

Anticuerpos humanizados

Como un terapia, los anticuerpo quiméricos sin todavía, frecuentemente, antigénicos, produciendo una respuesta inmune al anticuerpo anti-quimérico humano (HACA); otros anticuerpos quiméricos contral los receptores Notch2 y Notch3 pueden requerir una humanización adicional. Para generar los anticuerpos humanizados se diseñan las tres secuencias hipervariables cortas o regiones complementarias determinantes (CDRs), los dominios variables de las cadenas liviana y pesada del anticuerpo quimérico, usando

tecnología de DNA recombinante dentro del dominio variable del marco de una secuencia de cadena pesada y cadena liviana humana, respectivamente, y luego clonarla en un vector de expresión de mamífero para la expresión de células CHO. La inmunoreactividad y afinidad de los anticuerpos humanizados se comparadas con los anticuerpos quiméricos madre mediante ELISA y FACS. Adicionalmente, se puede usar mutagénesis sitio-dirigida o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc., del anticuerpo humanizado.

Ejemplo 18

Ensayos *in vitro* adicionales para evaluar los anticuerpos contra el receptor Notch

En este ejemplo se describen los métodos para los ensayos *in vitro* para probar la actividad de los anticuerpos generados contra Notch2 y/o Notch3 sobre la proliferación celular y citotoxicidad.

Ensayo de proliferación

Se ensaya el efecto de los anticuerpos contra Notch2 y Notch3 en el crecimiento de células tumorales *in vitro* usando un ensayo basado en BrdU. Se cultivan células de tumor de mama recientemente disociadas agotadas de Lin, en bajo oxígeno por 2-5 días. Luego las células se cultivan a 20,000células/pozo con 2.5μg/mL o 5.0μg/mL de anticuerpo de anticuerpo anti-Notch, el control es IgG murino no específico, o sin anticuerpo, por tres dúas, seguido por 18 horas de etiquetado BrdU. Todos los experimentos se llevan a cabo con múltiples réplicas. Se determina la habilidad de los anticuerpos anti-Notch de inhibir la proliferación celular mediante comparación con los anticuerpos control.

Ensayo de citotoxicidad complemento-dependiente

Se usan las líneas celulares cancerígenas que expresan los receptores Notch2 y/o Notch3, o alternativamente, las células madre cancerígenas aisladas de una muestra de paciente pasadas como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos, para medir la citotoxicidad complemento-dependiente (CDC) mediada por un anticuerpo contra los receptores Notch2 y/o Notch3. Las células se suspenden en 200μL del medio de cultivo RPMI

1640suplementado con antibióticos y 5%de FBS a 106 células/ml. Las células suspendidas son luego mezcladas con 200µL de suero o suero inactivado por calor con anticuerpo contra los receptores Notch2 y/o Notch3 o anticuerpos control, por triplicado. La mezcla de las células se incuba por 1 a 4 hroas a 37°C en CO_2 5%. Las células tratadas se colectan, resuspenden en 100µL anexina V conjugada con FITC diluido en un medio de cultivo e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Citometría de flujo de las células teñidas con FITC proporciona un conteo celular completo, se usa la entrada de yoduro de propidium por las células muertas como un porcentaje del número de células totales para medir la muerte celular en presencia de suero y los anticuerpos contra el receptor Notch2 y Notch3, comparado con suero inactivado pro calor y anticuerpos control. Así se determina la habilidad de los anticuerpos anti-Notch2/3 para mediar la citotoxicidad complemento-dependiente.

Ensayo de citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente

Se usan las líneas celulares cancerígenas que expresan los receptores Notch2 y/o Notch3, o alternativamente, las células madre cancerígenas aisladas de una muestra de paciente pasadas como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (se describe en detalle más abajo), para medir la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente (ADCC) mediada por un anticuerpo contra los receptores Notch2 y/o Notch3. Las células se suspenden en 200µL del medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con antibióticos libre de fenol rojo y 5%de FBS a 106 células/ml. Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMSc) se aíslan de sangre periférica heparinizada con centrifugación por gradiente de densidad Ficoll-Paque para usarlas como células efectoras. Las células objetivo (Y) se mezclan con células efectoras PBMC € en proporciones E/T de 25:1, 10:1 y 5:1 en placas de 96 pozos en presencia de receptor Notch2 o Notch3 o anticuerpo control. La mezcla de células se incuba por 1 a 6 horas a 37°C en CO_2 5%. Luego de la lisis celular se libera lactato deshidrogenasa (LDH) una enzima citosólica estable, esta LDH se mide mediante un ensayo colorimétrico (e.g., CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay; Promega; Madison, WI). Se recolectan los datos de absorbancia a 490nm en un lector de placas de 96 pzos estándar y se corrige el historial. El porcentaje de citotoxicidad se calcula de acuerdo a la fórmula % citotoxicidad = 100 x (liberación experimental LDH – liberación

espontánea de LDH del efector – liberación espontánea de LDH por el objetivo) / (máxima liberación de LDH del objetivo – liberación espontánea de LDH del objetivo). Así se determina la habilidad de los anticuerpos contra el receptor Notch2 y/o Notch3 para medir la citotoxicidad complemento-dependiente.

Ejemplo 19

Producción de anticuerpos contra EGF10 (o EGF equivalente) de receptores Notch

La identificación de un anticuerpo que se une específicamente a la décima repetición del EGF del Notch2 y el correspondiente se repite en el Notch3 (el noveno EGF repetido) que reduce el crecimiento tumoral en animales, sugiere la importancia de la unión al dominio no ligando, y la decima EGF repetida (o su equivalente) en particular, para terapias efectivas contra cáncer. Para apuntar al EGF 10 repetido (o equivalente EGF) en los miembros de la familia del receptor Notch, se producen anticuerpos contra el EGF10 del Norch1, Notch2 o Notch4 o EGF8 contra Noth3 y analizados. Específicamente, se inmunizan ratones con los antígenos comprendiendo el 10EGF del Notch repetido (SEQ ID NO:53), Notch2 (SEQ ID NO:36), o Notch4 (SEQ ID NO:38) o el noveno EGF repetido (SEQ ID NO:37). Los anticuerpos reconocieron específicamente receptores Notch así como el diferentes combinaciones de lo cuatro receptores Notch, lo anterior se identifica usando análisis FACS de células Hell-293 transfectadas con cada receptor Notch como se describe en detalle a continuación. Los anticuerpos que reconocen el décimo EFG repetido (o su EGF equivalente) de dos de las familiar de receptores Notch so previstos (e.g. anticuerpos que reconocen Notch1 EGF10 y Notch2 EGF10; Notch1 EGF10 y Notch3 EGF9; Notch1 EGF10 y Notch4 EGF10; Notch2 EGF10 y Notch3 EGF9; Notch2 EGF10 y Notch4 EGF10; o Notch3 EGF9 y Notch4 EGF10). También se contemplan los anticuerpos que reconocen el décimo EFG repetido (o el EFG equivalente) de tres miembros de la familia de receptores Notch (e.g. anticuerpos que reconocen el Notch1 EGF10, Notch2 EGF10, y Notch3 EGF9; Notch1 EGF10, Notch2 EGF10, y Notch4 EGF10; o Notch2 EGF10, Notch3 EGF9, y Notch4 EGF10). Y se tienen previstos anticuerpos que reconocen el décimo EGF repetido (o EGF equivalente) de cuatro

miembros de la familia de receptor Notch (e.g. anticuerpo que reconocen el Notch1 EGF10, Notch2 EGF10, Notch3 EGF9 y Notch4 EGF10).

Ejemplo 20

Tratamiento de cáncer humano usando anticuerpos anti- receptor Notch

Este ejemplo describe métodos para el tratamiento del cáncer usando anticuerpos contra el receptor Notch para elegir como blanco tumores que comprenden células madre cancerígenas en las cuales se ha detectado el receptor Notch de expresión.

La presencia de marcadores de expresión de células madre cancerígenas se puede determinar primero a partir de una biopsia de un tumor. Las células tumorales de una biopsia de un paciente diagnosticado con cáncer se remueven en condiciones estériles. En algunas realizaciones, el tejido fresco de la biopsia se congela con nitrógeno líquido, se embebe en O.C.T. y se corta en un criostato en secciones de 10μm en láminas de vidrio. Alternativamente, el tejido de la biopsia se fija en formalina, se embebe en parafina, y se corta con un microtono en secciones de 10 μm en láminas de vidrio. Las secciones se incuban con los anticuerpo contra el receptor Notch para detectar la expresión de la proteína. Adicionalmente, se puede determinar la presencia de las células madre cancerígenas. Las muestras del tejido de la biopsia se corta en pequeños pedazos, se muele completamente usando cuchillas estériles y se somete a las células a digestión enzimática y disrupción mecánica para obtener una suspensión de células individuales. Las células tumorales disociadas se incuban con los anticuerpos anti-ESA+, CD44+, CD24/bajo, Lin-, las células madre cancerígenas se determinan mediante citometría de flujo como se describió en detalle anteriormente.

Los pacientes de cáncer cuyos tumores se han diagnosticado como que expresan receptores Notch se tratan con anticuerpos anti-receptor Notch. Se generan anticuerpos humanizados o monoclonales humanos anti-receptor Notch como se describió anteriormente son purificados y formulados en un vehículo farmacéuticamente aceptable en PBS para inyección. Los pacientes se tratan con los anticuerpos Notch una vez a la semana, por al menos 10 semanas, pero en ciertos casos, una vez a la semana durante al menos 14 semanas. Cada administración del anticuerpo debe ser una dosis farmacéuticamente

efectiva de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml y en ciertos casos de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml. El anticuerpo puede ser administrado antes de, durante, o después de regímenes de radioterapia o quimioterapiausando uno o más agentes quimioterapéuticas, como paclitaxel, gemcitabina, irinotecano, oxaplatino, fluorouracilo, leucovorin o estreptozocina. Los pacientes se monitorean para determinar si ese tratamiento tiene un resultado en la respuesta antitumoral, por ejemplo, basado en la regresión del tumor, reducción en la incidencia de nuevos tumores, menor expresión tumoral antigénica, número de células madre cancerígenas disminuido, u otros medios de evaluación del pronóstico de la enfermedad.

Ejemplo 21

Producción de anticuerpos contra Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4 EGF repetido 4

Se produjeron los anticuerpos contra Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4 EGF repetido 4 y se analizaron para elegir como blanco el receptor Notch EGF repetido 4 dentro de los miembros de la familia. Específicamente los ratones son inmunizados con antígenos que comprenden el EGF repetido del Notch1 (SEQ ID NO:41), Notch 2 (SEQ ID NO:42), Notch3 (SEQ ID NO: 43), o Notch4 (SEQ ID NO:44). Se identificaron los anticuerpos que reconocen receptores Notch específicos así como los anticuerpos que reconocen diferentes combinaciones de los cuatro receptores Notch usando el análisis FACS de células HEK 293 trasnfectadas con cada uno de los receptores Notch como se describe en detalle anteriormente. Los anticuerpos que reconocen los cuatro EGF repetidos de dos miembros de la familia de receptores Notch son previstos (e.g. anticuerpos que reconocen los cuatro EGF repetidos de Notch1 y Notch2; Notch1 y Notch3; Notch1 y Notch4; Notch2 y Notch3; Notch2 y Notch4; o Notch3 y Notch4). Los anticuerpos que reconocen los cuatro EGF repetidos de tres miembros de la familia de receptores Notch son previstos (e.g. anticuerpos que reconocen los cuatro EGF repetidos de Notch1, Notch2, y Notch3; Notch1, Notch2, y Notch4; o Notch2, Notch3, y Notch4). Y los anticuerpos que reconocen los cuatro EGF repetidos de cuatro miembros de la familia de receptores Notch son previstos (e.g. anticuerpos que reconocen los cuatro EGF repetidos Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4).

Una descripción de la producción ejemplificada y caracterización del anticuerpo monoclonal 13M57, que se une al EGF4 del receptor Notch1 se puede encontrar en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el número de publicación US2008/0131434, que se incorpora como referencia a este documento en su totalidad.

Ejemplo 22

Ensayos de expresión génica adicionales en células tumorales tratadas con 59R1

Se identificaron los cambios en la expresión génica en respuesta al tratamiento con $59R^1$ en células tumorales en modelos de xenoinjerto.

Varios conjuntos de vías/genes que son regulados por el anticuerpo 59R1 en las células tumorales fueron identificados (Tabla 9) mediante el Gene Set Enrichment Analysis (Mootha et al., 2003, *Nature Genetics* 34:267-73; Subramanian et al., 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15545-50) en los tumores de mama T1, PE13 y B51. En particular, en este análisis las vías del ciclo celular genético, la activación de los genes myc y varios conjuntos de genes de células madre son regulados por 59R1. Se ha mostrado que el cMyc es un objetivo directo de la vía Notch (Weng et al., 2006, *Genes Dev.* 20:2096-109). El gen de célula madre que está regulado por 59R1 se derivó de una forma molecular derivada de 5 poblaciones diferentes: células madre hematopoyéticas (HCS), HSCs murina fetal y de adulto, células madre neurales (NSC), y células madre embrionarias (ESC) (Ivanova et al., 2002, *Science* 298:601-604), y adicionalmente un núcleo recientemente descrito del conjunto del gen ESC (Ben-Porath et al., 2008, *Nature Genetics* 40:499-507) y un conjunto de gen ESC de auto-renovación cuya regulación causa diferenciación (Hu et al., 2009, *Genes Dev.* 23:837-48).

Tabla 9

Nombre	Tamaño	FDR	Descripción
NGUYEN KERATO UP NOTCH	27	0.0774	Genes concomitantemente modulados por la activación de Notch1 en queratinocitos-Up de ratón y humano
CELLCYCLEPATHWAY	22	0.0798	Las ciclinas interactúan con quinasas dependientes de ciclinas para formar complejos de quinasas actives que regulan la progresión thr

YU CMYC UP	28	0.0884	Genes activados por Myc
HSC STHSC FETAL	27	0.0885	Reguladas en el ratón por las células madre hematopoyéticas del hígado del feto en un corto término (ST-HSC Shared)
HSC STHSC SHARED	27	0.0907	Reguladas en el ratón por las células madre hematopoyéticas del hueso y medula ósea de ratón adulto en un corto término
WEINBERG ESC EXP2	30	0.1001	40 genes que específicamente se sobre expresan en las células hES de acuerdo con el meta análisis de 8 perfiles de estudio
ESC SELF RENEWAL	30	0.1087	Genes identificados por el amplio análisis de genoma RNAI, cuya regulación causa diferenciación de mESC
BRENTANI REPAIR	33	0.1122	Genes relacionados con cáncer que involucran reparación de DNA

FDR <15%

Ejemplo 23

Reducción de la frecuencia de células madre cancerígenas por los anticuerpos Notch2/3

Usando un estudio experimental similar al descrito en el Ejemplo 8, se realizó un análisis de la frecuencia de células madre cancerígenas mediante la limitación del análisis de dilución en células madre cancerígenas PE13. Los animales portadores de los tumores de mama PE13 fueron tratados con anticuerpos de control, taxol más anticuerpos de control, 59R1, o 59R[1] más taxol o durante tres semanas. Los tumores fueron recolectados después de tres semanas, y se analizó la frecuencia de CSC en los tumores tratados. Se trasplantaron las valoraciones en serie de las células humanas de cada uno de los cuatro grupos de tratamiento a un nuevo conjunto de ratones (n = 10 por dosis de células). La tasa de crecimiento del tumor después de 75 días de crecimiento (Figura 19A) se utilizó para calcular la frecuencia de CSC usando el programa L-calc (Stem Cell Technologies, Inc.). Los tumores tratados con el anticuerpo control estaban determinados a tener una frecuencia de iniciación de células tumorales de 1:74. El tratamiento con taxol únicamente incremento la frecuencia de CSC a 1:30. Por el contrario, el tratamiento con 59R1 disminuyó la frecuencia de CSC a 1:179, y la combinación de tazol y 59R1 disminuyó la frecuencia de

CSC a 1:319 (Figura 19B). Un solo asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) frente al grupo tratado con el anticuerpo control, y un doble asterisco indica una diferencia significativa frente al taxol y el grupo tratado con el anticuerpo de control. Este experimento indica que el tratamiento de los tumores de mama PE13 con 59R1 reduce la frecuencia de CSC administrado como único agente y más aún, en combinación con el tratamiento con taxol. Por el contrario, el tratamiento con taxol solo, si bien es eficaz para reducir el volumen del tumor, incrementa la frecuencia en los tumores tratados de CSC, lo que indica que las células iniciadoras del tumor son preferencialmente resistentes a los efectos de este agente quimioterapéutico.

Adicionalmente a la investigación de los efectos del 59R1 en los tumores y sobre la frecuencia de CSC, se estudiaron cambios en los genes después del tratamiento con 59R1 en combinación con taxol. El experimento se realizó en tumores de mama PE13 en donde una disminución en la frecuencia de CSC después del tratamiento con 59R1 solo o 59R1 y taxol había sido observada previamente (y se describe en este documento). El análisis de los microensayos se realizó en los tumores del mismo experimento en donde se llevaron a cabo las limitaciones del análisis de dilución para la cuantificación de CSC (Figura 19). Los animales portadores de tumores de mama PE13 se trataron tres semanas antes de la recolección para el análisis de microensayos con 59R1 y taxol, y control y taxol. Se calcularon los valores promedio de la expresión diferencial para el taxol frente a control y 59R1 más taxol en los animales tratados (3 animales por grupo). Sorprendentemente, en los datos de expresión génica de los microensayos se encontró que el 59R1 en combinación con taxol afecta la apoptosis, hipoxia, diferenciación, y los genes relacionados con las células madre, en la dirección opuesta a los cambios genéticos observados después de taxol solo (Tabla 10), lo cual es consistente con los efectos de estos compuestos en la frecuencia de CSC.

Tabla 10

Taxol vs. control		59R1_Taxol vs. Taxol			
Fold	**pval**	**Fold**	**pval**	**Symbol**	**Name**
10.2	6.8E-03	-4.3	2.3E-01	BMPR1B	bone morphogenetic protein receptor, type IB
-2.1	4.2E-05	1.8	6.9E-05	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
-21.1	1.0E-02	11.9	3.9E-04	EGLN3	egl nine homolog 3
13.4	5.9E-05	-1.8	1.2E-01	HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6
2.2	1.5E-02	-2.5	1.9E-03	ITGAM	integrin, alpha M
4.6	3.6E-03	-4.4	5.2E-03	LHX8	LIM homeobox 8
-9.0	2.0E-06	6.4	1.8E-05	NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1
6.4	6.9E-06	-2.2	7.4E-03	RARRES1	retinoic acid receptor responder 1
2.6	3.5E-04	-1.7	1.1E-03	RARRES3	retinoic acid receptor responder 3
4.8	3.9E-05	-2.2	1.6E-02	RBP2	retinol binding protein 2, cellular
10.6	1.3E-10	-1.5	5.9E-02	XAF1	XIAP associated factor 1

Los genes relacionados con la apoptosis regulados en esta base de datos incluyen BNIP3, NDRG1 HSPB6 y XAF1. BNIP3 (Bcl-2/E1B 19 kDa proteína de interacción) es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 que se expresa en las regiones de hipoxia de los tumores (Kothari et al., 2003, oncogén 22:4734-44). BNIP3 es regulado por taxol solo y puede hasta ser regulados por terapia combinada, lo que sugiere que el taxol y 59R1 podría promover la apoptosis. La observación de que el HSPB6 es regulado tumores tratados con taxol es consistente con esta idea; la sobre expresión de HSPB6 puede proteger contra la apoptosis en algunos sistemas biológicos (Fan et al, 2005, Tendencias Cardiovasc Med 15:138-41). NDRG1 (N-myc Gen 1 regulado corriente abajo), que está regulado en el tratamiento combinado, es necesaria para la apoptosis dependiente de p53 (Stein et al., 2004, J. Biol. Chem.. 279:48930-40). Curiosamente, el NDRG1 también es un supresor putativo de metástasis de cáncer colorrectal. Su expresión incrementada se asocia con una mejor supervivencia en cáncer de próstata y de mama (Shah et al., 2005, Clin. Cancer Res. 11:3296-302). Además, el NDRG1 está involucrado en la promoción de la diferenciación. La expresión de NDRG1 ha demostrado ser altamente expresado en células de cáncer pancreático bien diferenciadas, y no se expresa en células de tumor menos diferenciado (Angst et al., 2006, fr. J. Cancer 95:307-13). Se observó también que otros genes relacionados con células madre, tales como BMPR1B y genes que contienen homeobox, LHX8, fueron reguladas por taxol solamente, y luego regulados con 59R1 en tratamiento combinado con paclitaxel.

Varios genes implicados en el metabolismo de los retinoides (RARRES1, RARRES3, RBP2), que son funcionalmente similares a los marcadores de células madre putativos, ALDH1a1, fueron reguladas positivamente por el taxol, y luego regulados negativamente

con el tratamiento de taxol y 59R1. Se ha demostrado que la señalización del ácido retinoico está vinculada a la diferenciación celular (Appel y Eisen, 2003, Neurona 40:461-4). En conjunto, estos datos muestran que el 59R1 tiene efectos significativos en la expresión génica en las células de tumor de mama PE13 y puede empezar a dilucidar algunos de los mecanismos que subyacen a la disminución en la frecuencia de células madre cancerígenas observada en este tumor después del tratamiento con terapia combinada de 59R1 y taxol.

En otra realización, se utilizó un modelo de tumor pancreático PN4 para probar la reducción de la frecuencia de células madre cancerígenas después del tratamiento con 59R1. Los tumores pancreáticos PN4 fueron tratados por un período de tres semanas con el anticuerpo control, anti-Notch2/3 59R1, gemcitabina, o una combinación de gemcitabina y 59R. Los anticuerpos fueron administrados a 10 mg/kg dos veces por semana, y la gemcitabina se administró a 50 mg/kg dos veces por semana. Los tumores de cada grupo fueron recolectados y procesados para obtener suspensiones de las células individuales. Se aislaron las células de tumores humanos en el xenoinjerto y se contaron. Una valoración de las células (30, 90 o 210 células) fueron re-inyectados en ratones NOD-SCID (n = 10 por grupo). El crecimiento del tumor se valoró el día 84 y la frecuencia de células iniciadoras del tumor se calculó a partir de la tasa de diseminación tumoral. Se estableció que los tumores tratados con el anticuerpo control tendrían una frecuencia de células iniciadoras de tumor de 1:137. El tratamiento con gemcitabina solamente aumentó la frecuencia de CSC a 1:61. Por el contrario, el tratamiento con 59R1 disminuyó la frecuencia de CSC a 1:281, y la combinación de gemcitabina y 59R1 disminuyó la frecuencia de CSC a 1:675 (Figura 19C). Un solo asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) frente al grupo tratado con el anticuerpo control, y un doble asterisco indica una diferencia significativa frente al grupo tratado con gemcitabina y el anticuerpo control.

En otra realización, se usó un modelo de tumor de mama PE13 para probar la reducción de la frecuencia de células madre del cáncer después del tratamiento con 59R5. Se trataron los tumores de mama PE13 por un período de tres semanas con el anticuerpo control, anti-Notch2/3 59R5, el taxol, o una combinación de taxol y 59R5. Los anticuerpos se administraron a dosis de 20 mg/kg una vez por semana, y el taxol fue administrado a dosis

de 15 mg/kg, dos veces por semana. Los tumores de cada grupo fueron recolectados y procesados para obtener suspensiones de células individuales. Se aislaron las células de tumores humanos en el xenoinjerto y se contaron. Una valoración de las células (50, 150 o 450 células) fueron re-inyectados en ratones NOD-SCID (n = 10 por grupo). El crecimiento del tumor se valoró el día 39 y la frecuencia de células iniciadoras del tumor se calculó a partir de la tasa de diseminación tumoral. Se estableció que los tumores tratados con el anticuerpo control tendrían una frecuencia de células iniciadoras de tumor de 1:70. El tratamiento con taxol solamente, aumentó la frecuencia de CSC a 1:30. Por el contrario, el tratamiento con 59R5 disminuyó la frecuencia de CSC a 1:202, y la combinación de taxol y 59R5 disminuyó frecuencia de CSC a 1:382 (Figura 19D). Un solo asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) frente al grupo tratado con el anticuerpo control, y un doble asterisco indica una diferencia significativa frente al grupo tratado con taxol y el anticuerpo control.

Como se observa en otros experimentos, estos resultados indican que el tratamiento del tumores pancreáticos PN4 con 59R1 y el tratamiento de tumores de mama PE13 con 59R5 reduce la frecuencia de CSC como único agente, y más dramáticamente en un tratamiento combinado con gemcitabina o taxol, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento con taxol o gemcitabina solamente, si bien es efectivo para reducir el volumen del tumor, incrementa la frecuencia de CSC en los tumores tratados, lo que indica que las células iniciadoras del tumor son preferencialmente resistentes a los efectos de estos agentes quimioterapéuticos.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas anterior especificación se incorporan aquí por referencia. Varias modificaciones y variaciones del método descrito y el sistema de la invención serán evidentes a las personas medianamente versadas en la técnica sin salir del alcance y el espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones concretas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe ser excesivamente limitada a tales realizaciones específicas. De hecho, varias modificaciones de las modalidades descritas para la realización de la invención que son evidentes para

SECUENCIAS

Secuencias de anticuerpos humanos anti-Notch2/3

SEQ ID NO: 1: Secuencia nucleótida que codifica la cadena pesada del 59R1 IgG2 anti-Notch2/3, más la secuencia señal. La secuencia que codifica la secuencia señal está subrayada.

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAG
GTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGC
TGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCT
GGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTATGCG
GATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATTTTT
TTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCT
AGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTG
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGC
CCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC
AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
TGA

SEQ ID NO: 16: Secuencia proteica prevista de la cadena pesada del 59R1 IgG2 anti-Notch2/3, más la secuencia señal. La secuencia que codifica la secuencia señal está subrayada.

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEW
VSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 3: Secuencia nucleótida que codifica la cadena liviana del 59R1 IgG2 anti-Notch2/3, más la secuencia señal. La secuencia que codifica la secuencia señal está subrayada.

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG
GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
CCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCG

GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCCTATTACCTTTGGC
CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 18: Secuencia proteica prevista de la cadena pesada del 59R1 IgG2 anti-Notch2/3, más la secuencia señal. La secuencia que codifica la secuencia señal está subrayada.
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPR
LLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 5: CDR1 de la cadena pesada de 59R1
SSSGMS

SEQ ID NO: 6: CDR2 de la cadena pesada de 59R1
VIASSGSNTYYADSVKG

SEQ ID NO: 7: CDR3 de la cadena pesada de 59R1
GIFFAI

SEQ ID NO: 8: CDR1 de la cadena liviana de 59R1
RASQSVRSNYLA

SEQ ID NO: 9: CDR2 de la cadena liviana de 59R1
GASSRAT

SEQ ID NO: 10: CDR3 de la cadena liviana de 59R1
QQYSNFPI

SEQ ID NO: 11: dominio VL de la cadena liviana del 59R1 Fab más la secuencia señal. La secuencia señal está subrayada.
MKKTAIAIAVALAGFATVAQADIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAP
RLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 12: dominio VH de la cadena pesada del 59R1 Fab más la secuencia señal. La secuencia señal está subrayada.
MKQSTIALALLPLLFTPVTKAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGL
EWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLV
TVSSA

SEQ ID NO: 13: dominio VL de la cadena liviana del anticuerpo 59R1 IgG
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGS
GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 14: dominio VH de la cadena pesada del anticuerpo 59R1 IgG
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 39: dominio VL de la cadena liviana del 59R1 más la secuencia de señal mamífera (subrayada)
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK
PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG
QGTKVEIKR

SEQ ID NO: 40: dominio VH de la cadena pesada del 59R1 más la secuencia de señal mamífera (subrayada)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP
GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIF
FAIWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 15: secuencia nucleótida que codifica la cadena pesada del anticuerpo 59RGV IgG2 anti-Notch2/3 (variante de línea germinal del 59R1), más la secuencia señal. La secuencia que codifica la secuencia señal está subrayada.
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTCGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCCGAG
GTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCC
TGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTCCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCTCCC
GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCAGCGGCTCCAACACCTACTACGCC
GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTG
CAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCATCTTC
TTCGCCATCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCT
TCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTG
ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTGGTGACAGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGAC
CACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAGTGC
CCTCCTTGCCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCT
AAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC
CACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGGC
CTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAG
GTGTACACCCTGCCTCCATCCAGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT
CTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCT
GAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTAC
TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGCAAG
TAG

SEQ ID NO: 2: Secuencia proteica prevista de la cadena pesada del 59RGV anti-Notch2/3 (variante de línea germinal del 59R1), más la secuencia señal. La secuencia que codifica la secuencia señal está subrayada.
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEW
VSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTV

SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17: secuencia nucleótida del anticuerpo 59RGV anti-Notch2/3 (variante de línea germinal del 59R1), más la secuencia señal. La secuencia que codifica la secuencia señal está subrayada.

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACACTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC
CTGAGCTGCAGGCGGGCCTCCCAGTCCGTGCGGTCCAACTACCTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCCGGACAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCCGGGCTACCGGCATC
CCTGCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTG
GAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTCCAACTTCCCTATCACCTTC
GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTC
CCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC
TTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAAC
TCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACC
CTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC
CAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAG

SEQ ID NO: 4: Secuencia proteica prevista de la cadena liviana del anticuerpo 59RGV anti-Notch2/3 (variante de línea germinal del 59R1), más la secuencia señal. La secuencia señal está subrayada.

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAP
RLLIYGASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 19: dominio VL de la cadena liviana del anticuerpo 59RGV (variante de línea germinal del 59R1)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 20: dominio VH de la cadena pesada del anticuerpo 59RGV (variante de línea germinal del 59R1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 22 (CDR3 de la cadena pesada alterna)

SIFYPT

SEQ ID NO: 23 (CDR3 de la cadena pesada alterna)

SSFFAS

SEQ ID NO: 24 (CDR3 de la cadena pesada alterna)

SSFYAS

SEQ ID NO: 25 (CDR3 de la cadena pesada alterna)
SSFFAT

SEQ ID NO: 26 (CDR3 de la cadena pesada alterna)
SIFYPS

SEQ ID NO: 27 (CDR3 de la cadena pesada alterna)
SSFFAN

SEQ ID NO: 30 (secuencia consenso de la CDR3 de la cadena pesada):
(G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N)

SEQ ID NO: 47: secuencia nucleótida de la cadena liviana del 59R5 (sin la secuencia señal)
GACATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCCACACTGTCCCTGTCTCCCGGCGAGAGAGCCACC
CTGAGCTGTCGGGCCTCCCAGTCCGTGCGGTCCAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG
CCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCAGGGCTACCGGCGTGCCT
GCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAG
CCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTCCAACTTCCCTATCACCTTCGGC
CAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCC
CCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTC
TACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCC
CAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTG
ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG
GGCCTGTCCTCTCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 48: secuencia nucleótida de la cadena pesada del 59R5 (sin la secuencia señal)
GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCA
CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCCGCCTCCACCAAGGGC
CCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTG
GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCC
CTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTG
TCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTG
GACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAG
TGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAG
CCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC
GCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCTGTGCTG
ACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
GGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCT
CAGGTCTACACCCTGCCTCCTAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAG
CCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTG
TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGC
AAG

SEQ ID NO: 49: cadena pesada del 59R5
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50: región variable de la cadena pesada del 59R5
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSSAST

SEQ ID NO: 51: CDR3 de la cadena pesada del 59R5
SIFYTT

SEQ ID NO: 52: región variable de la cadena pesada del 59R1 variante
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPTWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 53: región variable de la cadena pesada del 59R1 variante
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFASWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 54: región variable de la cadena pesada del 59R1 variante
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFYASWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 55: región variable de la cadena pesada del 59R1 variante
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFATWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 56: región variable de la cadena pesada del 59R1 variante
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPSWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 57: región variable de la cadena pesada del 59R1 variante
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFANWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 58: secuencia nucleótida de la región variable de la cadena pesada del 59R5 (sin secuencia señal)
GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCA
CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCCGCCTCCACC

SEQ ID NO: 59: secuencia nucleótida de la región variable de la cadena liviana del 59R1 (sin secuencia señal)

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
CCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCG
GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCCTATTACCTTTGGC
CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGT

SEQ ID NO: 60: secuencia nucleótida de la región variable de la cadena pesada del 59R1 (sin secuencia señal)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTG
AGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTAT
GCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATT
TTTTTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCC

Secuencias humanas relacionadas con Notch:

SEQ ID NO: 21: secuencia aminoácida de la proteína de fusión Notch2(EGF1-12) Fc

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGEYCQHRD
PCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDTYECT
CQVGFTGKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCETDVNECDIPGHCQHGGTC
LNLPGSYQCQCPQGFTGQYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTGDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDC
PNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGW
SGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASFSCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLN
GQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAFHCECLKGYAGPRCEMDINECHS
DPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 28: (componente potencial del sitio de unión del 59R1 dentro del EGF10 de la Notch2 humana):
HKGAL

SEQ ID NO: 29 (sitio dentro del EGF9 de la Notch2 humana que corresponde al componente potencial del sitio de unión del 59R1 dentro del EGF10 de la Notch2 humana):
HEDAI

SEQ ID NO: 45: hNotch1
Aminoácidos 1-1732 dominio extracelular (subrayado)
Aminoácidos 372-414 repetición EGF (subrayado doble y en cursiva)

MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPRCQDPNPCLST
PCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCRNGGTCDLLTLTEYKCRCPPG
WSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVNECGQKPGLCRHGGTCHNE
VGSYRCVCRATHTGPNCERPYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVTHECACLPGFTGQNCEENIDDCPGN

NCKNGGACVDGVNTYNCRCPPEWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWTGE
DCSENIDDCASAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRTGLLCH*LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKA*
*ICTCPSGYTGPACSQDVD*ECSLGANPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQ
NDATCLDQIGEFQCICMPGYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLCQYD
VDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPG
YTGHHCETNINECSSQPCRHGGTCQDRDNAYLCFCLKGTTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKID
GYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPEGYHDPTCLSEVNECNSNPCV
HGACRDSLNGYKCDCDPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCREGFSGPNCQTNI
NECASNPCLNQGTCIDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSCVCP
TGWQGQTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTHGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCTD
GINTAFCDCLPGFRGTFCEEDINECASDPCRNGANCTDCVDSYTCTCPAGFSGIHCENNTPDCTES
SCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQHDVNECDSQPCLHGGTCQDGCGSYRCTCPQGYTGPNC
QNLVHWCDSSPCKNGGKCWQTHTQYRCECPSGWTGLYCDVPSVSCEVAAQRQGVDVARLCQHGGLC
VDAGNTHHCRCQAGYTGSYCEDLVDECSPSPCQNGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVNCSEEIDECL
SHPCQNGGTCLDLPNTYKCSCPRGTQGVHCEINVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCT
CPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPCKNGG
TCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTCLCLGPFTGPECQFP
ASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGGAGRDIPPPLIEEACELP
ECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSQCNSAGCLFDG
FDCQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQ
LRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKA
SLLPGGSEGGRRRRELDPMDVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFLGALASLGSLNIPY
KIEAVQSETVEPPPPAQLHFMYVAAAAFVLLFFVGCGVLLSRKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKK
RREPLGEDSVGLKPLKNASDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEEPVVLPDLDDQTDHRQWTQQHL
DAADLRMSAMAPTPPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPAVISDFI
YQGASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPLHAAVSADAQGVFQIL
IRNRATDLDARMHDGTTPLILAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAAVNNVDAAVV
LLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRL
LDEYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGKKVRKPSSKGLACGSKEAKDLKA
RRKKSQDGKGCLLDSSGMLSPVDSLESPHGYLSDVASPPLLPSPFQQSPSVPLNHLPGMPDTHLGI
GHLNVAAKPEMAALGGGGRLAFETGPPRLSHLPVASGTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEW
LSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAPSLQHGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQ
PHLVQTQQVQPQNLQMQQQNLQPANIQQQQSLQPPPPPPQPHLGVSSAASGHLGRSFLSGEPSQAD
VQPLGPSSLAVHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAAQFLTPPSQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHP
FLTPSPESPDQWSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIPEAFK

SEQ ID NO: 31: Notch2 humana
Aminoácidos 1-1677 dominio extracelular (subrayado)
Aminoácidos 375-417 repetición EGF (subrayado doble y en cursiva)

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGEYCQHRD
PCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDTYECT
CQVGFTGKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCETDVNECDIPGHCQHGGTC
LNLPGSYQCQCPQGFTGQYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTGDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDC
PNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGW
SGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASFSCMCPEGKAGLLCH*LDDACISNPCHKGALCDTNPLN*
*GQYICTCPQGYKGADCTEDVD*ECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAFHCECLKGYAGPRCEMDINECHS
DPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELEINECQSNPCVNNGQCVDKVNRFQCLCPPGFTGPV
CQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPNGYECQCATGFTGVLCEENIDNCDPDPCHHGQCQDGIDSYTCI
CNPGYMGAICSDQIDECYSSPCLNDGRCIDLVNGYQCNCQPGTSGVNCEINFDDCASNPCIHGICM
DGINRYSCVCSPGFTGQRCNIDIDECASNPCRKGATCINGVNGFRCICPEGPHHPSCYSQVNECLS
NPCIHGNCTGGLSGYKCLCDAGWVGINCEVDKNECLSNPCQNGGTCDNLVNGYRCTCKKGFKGYNC

QVNIDECASNPCLNQGTCFDDISGYTCHCVLPYTGKNCQTVLAPCSPNPCENAAVCKESPNFESYT
CLCAPGWQGQRCTIDIDECISKPCMNHGLCHNTQGSYMCECPPGFSGMDCEEDIDDCLANPCQNGG
SCMDGVNTFSCLCLPGFTGDKCQTDMNECLSEPCKNGGTCSDYVNSYTCKCQAGFDGVHCENNINE
CTESSCFNGGTCVDGINSFSCLCPVGFTGSFCLHEINECSSHPCLNEGTCVDGLGTYRCSCPLGYT
GKNCQTLVNLCSRSPCKNKGTCVQKKAESQCLCPSGWAGAYCDVPNVSCDIAASRRGVLVEHLCQH
SGVCINAGNTHYCQCPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDFIGGYRCECVPGYQGVNCEYEV
DECQNQPCQNGGTCIDLVNHFKCSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPHCLNGGQCMDRIGGYSCRCLP
GFAGERCEGDINECLSNPCSSEGSLDCIQLTNDYLCVCRSAFTGRHCETFVDVCPQMPCLNGGTCA
VASNMPDGFICRCPPGFSGARCQSSCGQVKCRKGEQCVHTASGPRCFCPSPRDCESGCASSPCQHG
GSCHPQRQPPYYSCQCAPPFSGSRCELYTAPPSTPPATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWDG
GDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINNQCDELCNTVECLFDNFECQGNSKTCKYDKYCADHFKDNHC
DQGCNSEECGWDGLDCAADQPENLAEGTLVIVVLMPPEQLLQDARSFLRALGTLLHTNLRIKRDSQ
GELMVYPYYGEKSAAMKKQRMTRRSLPGEQEQEVAGSKVFLEIDNRQCVQDSDHCFKNTDAAAALL
ASHAIQGTLSYPLVSVVSESLTPERTQLLYLLAVAVVIILFIILLGVIMAKRKRKHGSLWLPEGFT
LRRDASNHKRREPVGQDAVGLKNLSVQVSEANLIGTGTSEHWVDDEGPQPKKVKAEDEALLSEEDD
PIDRRPWTQQHLEAADIRRTPSLALTPPQAEQEVDVLDVNVRGPDGCTPLMLASLRGGSSDLSDED
EDAEDSSANIITDLVYQGASLQAQTDRTGEMALHLAARYSRADAAKRLLDAGADANAQDNMGRCPL
HAAVAADAQGVFQILIRNRVTDLDARMNDGTTPLILAARLAVEGMVAELINCQADVNAVDDHGKSA
LHWAAAVNNVEATLLLLKNGANRDMQDNKEETPLFLAAREGSYEAAKILLDHFANRDITDHMDRLP
RDVARDRMHHDIVRLLDEYNVTPSPPGTVLTSALSPVICGPNRSFLSLKHTPMGKKSRRPSAKSTM
PTSLPNLAKEAKDAKGSRRKKSLSEKVQLSESSVTLSPVDSLESPHTYVSDTTSSPMITSPGILQA
SPNPMLATAAPPAPVHAQHALSFSNLHEMQPLAHGASTVLPSVSQLLSHHHIVSPGSGSAGSLSRL
HPVPVPADWMNRMEVNETQYNEMFGMVLAPAEGTHPGIAPQSRPPEGKHITTPREPLPPIVTFQLI
PKGSIAQPAGAPQPQSTCPPAVAGPLPTMYQIPEMARLPSVAFPTAMMPQQDGQVAQTILPAYHPF
PASVGKYPTPPSQHSYASSNAAERTPSHSGHLQGEHPYLTPSPESPDQWSSSSPHSASDWSDVTTS
PTPGGAGGGQRGPGTHMSEPPHNNMQVYA

SEQ ID NO: 32: Notch3 humana
Aminoácidos 1-1640 dominio extracelular (subrayado)
Aminoácidos 351-393: repetición EGF (subrayado doble y en cursiva)
MGPGARGRRRRRRPMSPPPPPPPVRALPLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQLPSREAACL
CPPGWVGERCQLEDPCHSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCPRGFRGPDCSLPDPCLSSPCAHGA
RCSVGPDGRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPA
VPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEGQNCEVNVDDCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPP
EWTGQFCTEDVDECQLQPNACHNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCH
DRVASFYCACPMGKTGLLCH*LDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVD*ECS
IGANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIGQFTCICMAGFT
GTYCEVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECASTPCRNGAKCVDQPDG
YECRCAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDGIASFSCACAPGYTGTRCESQVDECRSQPCRHG
GKCLDLVDKYLCRCPSGTTGVNCEVNIDDCASNPCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINE
CASSPCGEGGSCVDGENGFRCLCPPGSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSG
PRCSQSLARDACESQPCRAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQ
LPVCSCPQGWQGPRCQQDVDECAGPAPCGPHGICTNLAGSFSCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNPC
LNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPGYGGFHCEQD
LPDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCLHGGVCSAAHPGFRCTCLE
SFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGWSGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQ
AGGQCVDEDSSHYCVCPEGRTGSHCEQEVDPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDD
VDECASQPCQHGGSCIDLVARYLCSCPPGTLGVLCEINEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGG
FRCTCPPGYTGLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQP
CQHGGQCRPSPGPGGGLTFTCHCAQPFWGPRCERVARSCRELQCPVGVPCQQTPRGPRCACPPGLS
GPSCRSFPGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPAPLAPFFRCACAQGWTGPRCEAPAAAPEVSEEPR

CPRAACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWRQCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACL
YDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADGRCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVL
LPPEELLRSSADFLQRLSAILRTSLRFRLDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVML
EIDNRLCLQSPENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPLEPPEPSVPLLPLLVAG
AVLLLVILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGESLMGE
VATDWMDTECPEAKRLKVEEPGMGAEEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPAMALTPPQGDADADGMDV
NVRGPDGFTPLMLASFCGGALEPMPTEEDEADDTSASIISDLICQGAQLGARTDRTGETALHLAAR
YARADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRTPLHTAVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAA
RLAVEGMVEELIASHADVNAVDELGKSALHWAAAVNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAA
REGSYEAAKLLLDHFANREITDHLDRLPRDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPP
GAFLPGLKAAQSGSKKSRRPPGKAGLGPQGPRGRGKKLTLACPGPLADSSVTLSPVDSLDSPRPFG
GPPASPGGFPLEGPYAAATATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNPVAVPLDWARLPPP
APPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTPVSPQERPPPYLAVPGHGEEYPVAGAHSSPPKARFLRVPSEHPY
LTPSPESPEHWASPSPPSLSDWSESTPSPATATGAMATTTGALPAQPLPLSVPSSLAQAQTQLGPQ
PEVTPKRQVLA

SEQ ID NO: 46: Notch4 humana
Aminoácidos 1-1444 dominio extracelular (subrayado)
Aminoácidos 392-434: repetición EGF (subrayado doble y en cursiva)

MQPPSLLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCGSFPEPCANGGTCLSLSLGQGTCQCAPGFLGETCQFPD
PCQNAQLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLEDPCPPSFCSKRGR
CHIQASGRPQCSCMPGWTGEQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACERDVNEC
FQDPGPCPKGTSCHNTLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPPRGCSNGGTCQLMPEKDSTFHLCLC
PPGFIGPDCEVNPDNCVSHQCQNGGTCQDGLDTYTCLCPETWTGWDCSEDVDECETQGPPHCRNGG
TCQNSAGSFHCVCVSGWGGTSCEENLDDCIAATCAPGSTCIDRVGSFSCLCPPGRTGLLCH*LEDMC*
*LSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLD*ECLMAQQGPSPCEHGGSCLNTPGSFNCL
CPPGYTGSRCEADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATFHCLCPPGLEGQLCEVETNECASAPCLNHADC
HDLLNGFQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQDQPGAFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECL
SDPCPVGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCQPKQICKDQKDKANCLCPDGSPGCAP
PEDNCTCHHGHCQRSSCVCDVGWTGPECEAELGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCTCPTGYTGPTC
SEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGGYYCTCPPSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGGTCVNRPGTFSCL
CAMGFQGPRCEGKLRPSCADSPCRNRATCQDSPQGPRCLCPTGYTGGSCQTLMDLCAQKPCPRNSH
CLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSGPSYFCHCPPGFQG
SLCQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGYDGQNCSKELDACQSQPCHNHGTCTPKPGGF
HCACPPGFVGLRCEGDVDECLDQPCHPTGTAACHSLANAFYCQCLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCF
HGGTCEATAGSPLGFICHCPKGFEGPTCSHRAPSCGFHHCHHGGLCLPSPKPGFPPRCACLSGYGG
PDCLTPPAPKGCGPPSPCLYNGSCSETTGLGGPGFRCSCPHSSPGPRCQKPGAKGCEGRSGDGACD
AGCSGPGGNWDGGDCSLGVPDPWKGCPSHSRCWLLFRDGQCHPQCDSEECLFDGYDCETPPACTPA
YDQYCHDHFHNGHCEKGCNTAECGWDGGDCRPEDGDPEWGPSLALLVVLSPPALDQQLFALARVLS
LTLRVGLWVRKDRDGRDMVYPYPGARAEEKLGGTRDPTYQERAAPQTQPLGKETDSLSAGFVVVMG
VDLSRCGPDHPASRCPWDPGLLLRFLAAMAAVGALEPLLPGPLLAVHPHAGTAPPANQLPWPVLCS
PVAGVILLALGALLVLQLIRRRRREHGALWLPPGFTRRPRTQSAPHRRRPPLGEDSIGLKALKPKA
EVDEDGVVMCSGPEEGEEVGQAEETGPPSTCQLWSLSGGCGALPQAAMLTPPQESEMEAPDLDTRG
PDGVTPLMSAVCCGEVQSGTFQGAWLGCPEPWEPLLDGGACPQAHTVGTGETPLHLAARFSRPTAA
RRLLEAGANPNQPDRAGRTPLHAAVAADAREVCQLLLRSRQTAVDARTEDGTTPLMLAARLAVEDL
VEELIAAQADVGARDKWGKTALHWAAAVNNARAARSLLQAGADKDAQDNREQTPLFLAAREGAVEV
AQLLLGLGAARELRDQAGLAPADVAHQRNHWDLLTLLEGAGPPEARHKATPGREAGPFPRARTVSV
SVPPHGGGALPRCRTLSAGAGPRGGGACLQARTWSVDLAARGGGAYSHCRSLSGVGAGGGPTPRGR
RFSAGMRGPRPNPAIMRGRYGVAAGRGGRVSTDDWPCDWVALGACGSASNIPIPPPCLTPSPERGS
PQLDCGPPALQEMPINQGGEGKK

SEQ ID NO: 33: secuencia polinucleótida codificando EGF 1-12 Notch2 humana

ATGCCCGCCCTGCGCCCCGCTCTGCTGTGGGCGCTGCTGGCGCTCTGGCTGTGCTGCGCG
GCCCCCGCGCATGCATTGCAGTGTCGAGATGGCTATGAACCCTGTGTAAATGAAGGAATG
TGTGTTACCTACCACAATGGCACAGGATACTGCAAATGTCCAGAAGGCTTCTTGGGGGAA
TATTGTCAACATCGAGACCCCTGTGAGAAGAACCGCTGCCAGAATGGTGGGACTTGTGTG
GCCCAGGCCATGCTGGGGAAAGCCACGTGCCGATGTGCCTCAGGGTTTACAGGAGAGGAC
TGCCAGTACTCAACATCTCATCCATGCTTTGTGTCTCGACCCTGCCTGAATGGCGGCACA
TGCCATATGCTCAGCCGGGATACCTATGAGTGCACCTGTCAAGTCGGGTTTACAGGTAAG
GAGTGCCAATGGACGGATGCCTGCCTGTCTCATCCCTGTGCAAATGGAAGTACCTGTACC
ACTGTGGCCAACCAGTTCTCCTGCAAATGCCTCACAGGCTTCACAGGGCAGAAATGTGAG
ACTGATGTCAATGAGTGTGACATTCCAGGACACTGCCAGCATGGTGGCACCTGCCTCAAC
CTGCCTGGTTCCTACCAGTGCCAGTGCCCTCAGGGCTTCACAGGCCAGTACTGTGACAGC
CTGTATGTGCCCTGTGCACCCTCACCTTGTGTCAATGGAGGCACCTGTCGGCAGACTGGT
GACTTCACTTTTGAGTGCAACTGCCTTCCAGGTTTTGAAGGGAGCACCTGTGAGAGGAAT
ATTGATGACTGCCCTAACCACAGGTGTCAGAATGGAGGGGTTTGTGTGGATGGGGTCAAC
ACTTACAACTGCCGCTGTCCCCCACAATGGACAGGACAGTTCTGCACAGAGGATGTGGAT
GAATGCCTGCTGCAGCCCAATGCCTGTCAAAATGGGGGCACCTGTGCCAACCGCAATGGA
GGCTATGGCTGTGTATGTGTCAACGGCTGGAGTGGAGATGACTGCAGTGAGAACATTGAT
GATTGTGCCTTCGCCTCCTGTACTCCAGGCTCCACCTGCATCGACCGTGTGGCCTCCTTC
TCTTGCATGTGCCCAGAGGGGAAGGCAGGTCTCCTGTGTCATCTGGATGATGCATGCATC
AGCAATCCTTGCCACAAGGGGGCACTGTGTGACACCAACCCCCTAAATGGGCAATATATT
TGCACCTGCCCACAAGGCTACAAAGGGGCTGACTGCACAGAAGATGTGGATGAATGTGCC
ATGGCCAATAGCAATCCTTGTGAGCATGCAGGAAAATGTGTGAACACGGATGGCGCCTTC
CACTGTGAGTGTCTGAAGGGTTATGCAGGACCTCGTTGTGAGATGGACATCAATGAGTGC
CATTCAGACCCCTGCCAGAATGATGCTACCTGTCTGGATAAGATTGGAGGCTTCACATGT
CTGTGCATGCCAGGTTTCAAAGGTGTGCATTGTGAATTA

SEQ ID NO: 34: secuencia polipeptídica del EGF 1-12 Notch2 humana

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGE
YCQHRDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGT
CHMLSRDTYECTCQVGFTGKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCE
TDVNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGFTGQYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTG
DFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVD
ECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASF
SCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECA
MANSNPCEHAGKCVNTDGAFHCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTC
LCMPGFKGVHCEL

SEQ ID NO: 35: EGF 10 Notch1 humana

LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVD

SEQ ID NO: 36: EGF 10 Notch2 humana

LDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVD

SEQ ID NO: 37: EGF 9 Notch3 humana (EGF9 es la EGF de la Notch3 humana la cual corresponde al EGF10 de los otros receptores Notch incluyendo la Notch2)

LDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVD

SEQ ID NO: 38: EGF 10 Notch4 humana

LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLD

SEQ ID NO: 41: EGF repetición 4 Notch1 humana
QADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQ

SEQ ID NO: 42: EGF repetición 4 Notch2 humana
TDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCET

SEQ ID NO: 43: EGF repetición 4 Notch3 humana
SDVDECRVGEPCRHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCEN

SEQ ID NO: 44: EGF repetición 4 Notch4 humana
RDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACER

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado el cual se fija de manera específica a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de la Notch2 humana, en donde el anticuerpo se fija de manera específica a la repetición 10 EGF de la Notch2 humana.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, el cual es un antagonista de la Notch2 humana.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual inhibe la fijación de un ligando con una Notch2 humana.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el ligando es DLL4, JAG1, y/o JAG2.

5. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, el cual inhibe la señalización de la Notch2 humana.

6. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, el cual fija la Notch2 humana con un K_D de aproximadamente 1 nM o menos.

7. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el cual no se fija a ninguna región de la Notch2 humana por fuera de la repetición 10 EGF.

8. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo se fija a por lo menos parte de la secuencia HKGAL (SEQ ID NO:28) dentro de la repetición 10 EGF de la Notch2.

9. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el cual además se fija de manera específica a por lo menos un receptor adicional de la Notch humana.

10. El anticuerpo según la reivindicación 9, el cual comprende un sitio de fijación de antígenos que fija la región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de tanto la Notch2 humana como el(los) receptor(es) adicional(es) de la Notch humana.

11. El anticuerpo según la reivindicación 10, en donde el receptor adicional de la Notch humana es la Notch3 humana.

12. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el cual además se fija de manera específica a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de la Notch3 humana, en donde el anticuerpo se fija de manera específica a la repetición 9 EGF de la Notch3 humana.

13. El anticuerpo según la reivindicación 12, el cual comprende un sitio fijador de antígenos el cual fija tanto la repetición 9 EGF de la Notch3 humana como la repetición 10 EGF de la Notch2.

14. El anticuerpo según la reivindicación 12 ó 13, el cual es un antagonista de la Notch3 humana.

15. El anticuerpo según la reivindicación 14, el cual inhibe la fijación de un ligando a la Notch3 humana.

16. El anticuerpo según la reivindicación 15, en donde el ligando es DLL4, JAG1, y/o JAG2.

17. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 14-16, el cual inhibe la señalización de la Notch3 humana.

18. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 12-17, el cual fija la Notch3 humana con un K_D de aproximadamente 1 nM o menos.

19. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 12-18, el cual no se fija a ninguna región de la Notch3 humana por fuera de la repetición 9 EGF.

20. Un anticuerpo aislado el cual se fija de manera específica a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de la Notch3 humana, en donde el anticuerpo se fija de manera específica a la repetición 9 EGF de la Notch3 humana.

21. El anticuerpo según la reivindicación 20, el cual es un antagonista de la Notch3 humana.

22. El anticuerpo según la reivindicación 21, el cual inhibe la fijación de un ligando a la Notch3 humana.

23. El anticuerpo según la reivindicación 22, en donde el ligando es DLL4, JAG1, y/o JAG2.

24. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 21-23, el cual inhibe la señalización de la Notch3 humana.

25. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20-24, el cual fija la Notch3 humana con un K_D de aproximadamente 1 nM o menos.

26. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20-25, el cual no se fija a ninguna región de la Notch3 humana por fuera de la repetición 9 EGF.

27. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20-26, en donde el anticuerpo se fija a por lo menos parte de la secuencia HEDAI (SEQ ID NO:29) dentro de la repetición 9 EGF de la Notch3.

28. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20-27, el cual además se fija de manera específica a la repetición 10 EGF de por lo menos un receptor adicional de la Notch humana.

29. El anticuerpo según la reivindicación 28, el cual comprende un sitio de fijación de antígenos que fija la región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de tanto la Notch3 humana como el(los) receptor(es) adicional(es) de la Notch humana.

30. Un anticuerpo codificado por el polinucleótido depositado con la ATCC como 59R1 ó PTA-9547.

31. Un anticuerpo el cual fija de manera específica la Notch2 y/o Notch3 humanas, en donde el anticuerpo comprende

(a) una CDR1 de la cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, ó 4 sustituciones aminoácidas conservadoras;

(b) una CDR2 de la cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, ó 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y

(c) una CDR3 de la cadena pesada que comprende, bien sea SIFYTT (SEQ ID NO:51) ó GIFFAI (SEQ ID NO:7), o una variante de las mismas que comprenden 1, 2, 3, ó 4 sustituciones aminoácidas conservadoras.

32. El anticuerpo según la reivindicación 31, en donde la CDR1 de la cadena pesada comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), la CDR2 de la cadena pesada comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y la CDR3 de la cadena pesada comprende SIFYTT (SEQ ID NO: 51).

33. Un anticuerpo que fija de manera específica la Notch2 y/o Notch3 humanas, en donde el anticuerpo comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de la cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y una CDR3 de la cadena pesada que comprende (G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30).

34. El anticuerpo de la reivindicación 33, en donde la CDR3 de la cadena pesada es seleccionada a partir del grupo que consiste de GIFFAI (SEQ ID NO:7), SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26), y SSFFAN (SEQ ID NO:27).

35. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 31-34, el cual además comprende:

(a) una CDR1 de la cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), o una variante del mismo que comprende 1, 2, 3, ó 4 sustituciones aminoácidas conservadoras;

(b) una CDR2 de la cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), o una variante del mismo que comprende 1, 2, 3, ó 4 sustituciones aminoácidas conservadoras; y

(c) una CDR3 de la cadena liviana que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), o una variante del mismo que comprende 1, 2, 3, ó 4 sustituciones aminoácidas conservadoras.

36. El anticuerpo según la reivindicación 35, en donde la CDR1 de la cadena liviana comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), la CDR2 de la cadena liviana comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y/o la CDR3 de la cadena liviana comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

37. Un anticuerpo el cual fija de manera específica una región no fijadora de ligandos de una dominio extracelular de la Notch2 y/o Notch3 humanas, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de la cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y una CDR3 de la cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO: 51) ó GIFFAI (SEQ ID NO:7); y/o

(b) una CDR1 de la cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de la cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y una CDR3 de la cadena liviana comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

38. El anticuerpo de la reivindicación 37, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de la cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y una CDR3 de la cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO: 51); y

(b) una CDR1 de la cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de la cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y una CDR3 de la cadena liviana comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

39. El anticuerpo de la reivindicación 37, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:5), una CDR2 de la cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), y una CDR3 de la cadena pesada que comprende GIFFAI (SEQ ID NO:7); y

(b) una CDR1 de la cadena liviana que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), una CDR2 de la cadena liviana que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:9), y una CDR3 de la cadena liviana comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

40. Un anticuerpo el cual fija de manera específica la Notch2 y/o Notch3 humanas, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que tenga por lo menos un 90% aproximadamente de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:14, ó SEQ ID NO:20; y/o

(b) una región variable de la cadena pesada que tenga por lo menos un 90% aproximadamente de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:13 ó SEQ ID NO:19.

41. El anticuerpo de la reivindicación 40, el cual comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que tenga por lo menos un 95% aproximadamente de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:50 ó SEQ ID NO:14; y/o

(b) una región variable de la cadena liviana que tenga por lo menos un 95% aproximadamente de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:13.

42. El anticuerpo de la reivindicación 41, el cual comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprenda la SEQ ID NO:50; y/o

(b) una región variable de la cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:13.

43. El anticuerpo de la reivindicación 41, el cual comprende:
(a) un polipéptido que comprenda la SEQ ID NO:14; y/o
(b) un polipéptido que comprenda la SEQ ID NO:13.

44. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-43, el cual fija de manera específica la Notch2 humana.

45. El anticuerpo de la reivindicación 44, el cual además fija de manera específica la Notch3 humana.

46. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-43, el cual se fija a la repetición 10 EGF de la Notch2 humana y/o la repetición 9 EGF de la Notch3 humana.

47. Un anticuerpo aislado el cual compite para fijación específica a la Notch2 y/o Notch3 humanas con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 30 a la 43.

48. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 30-43, el cual es un antagonista de la Notch2 y/o Notch3 humanas.

49. Un anticuerpo aislado el cual se fija de manera específica a una región no fijadora de ligandos de un dominio extracelular de dos o más receptores Notch humanos, en donde si los dos o más receptores Notch humanos comprenden las Notch2, Notch1, ó Notch4, entonces el anticuerpo se fija de manera específica a la EGF10 de las Notch2, Notch1 ó Notch4, y si los dos o más receptores Notch humanos comprenden la Notch3, entonces el anticuerpo se fija a la EGF9 de la Notch3.

50. El anticuerpo de la reivindicación 49, en donde el anticuerpo es un antagonista de los dos o más receptores Notch humanos.

51. El anticuerpo de la reivindicación 49 ó 50, en donde los dos o más receptores Notch humanos comprenden tanto la Notch1 como la Notch4.

52. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-51, el cual inhibe el crecimiento tumoral.

53. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-52, el cual es un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, o un fragmento de anticuerpo.

54. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-53, el cual es un anticuerpo biespecífico.

55. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-53, el cual es un anticuerpo monoespecífico.

56. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55, el cual es un anticuerpo IgG1 ó IgG2.

57. Una célula la cual comprende o produce el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-56.

58. Una composición farmacéutica la cual comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-56.

59. Un método de inhibir la señalización de la Notch3 en una célula el cual comprende contactar la célula con una cantidad efectiva del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11-43, 45-48, ó 52-56.

60. Un método de inhibir la señalización de la Notch2 en una célula el cual comprende contactar la célula con una cantidad efectiva del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, 30-48, ó 52-56.

61. Un método de inhibir la angiogénesis en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-48 ó 52-56.

62. El método de la reivindicación 61, el cual es un método de inhibición de la angiogénesis mediante la modulación de la función de los pericitos y/o células de músculo liso vascular.

63. El método de la reivindicación 61 ó 62, en donde la angiogénesis es la angiogénesis tumoral.

64. Un método de inhibir un crecimiento tumoral en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-56.

65. Un método de reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-56.

66. El método de la reivindicación 65, en donde la frecuencia de las células madre cancerígenas en el tumor es reducida.

67. El método de la reivindicación 64, 65 ó 66 en donde el tumor es un tumor colorectal, tumor de mama, tumor pancreático, o melanoma.

68. Un método para tratar una enfermedad asociada con la angiogénesis en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-48 ó 52-56.

69. Un método para tratar cáncer en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-56.

70. El método de la reivindicación 69, en donde el cáncer es un cáncer colorectal, cáncer de mama, cáncer pancreático, o melanoma.

71. El método según cualquiera de las reivindicaciones 61-70, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente, en donde el segundo agente es un agente anti-cancerígeno y/o un agente anti-angiogénico.

72. El método de la reivindicación 71, en donde el segundo agente es un agente quimioterapéutico.

73. El método de la reivindicación 72, en donde el agente quimioterapéutico es paclitaxel, gemcitabina, o irinotecan.

74. El método de la reivindicación 71, en donde el segundo agente es un antagonista del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del VEGF.

75. El método de la reivindicación 71, en donde el segundo agente es un anticuerpo anti-DLL4.

76. El método según cualquiera de las reivindicaciones 61-75, en donde el sujeto es humano.

77. Un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste de las SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, y SEQ ID NO:49.

78. Un polinucleótido el cual comprende una secuencia polinucleótida la cual codifica el polipéptido de la reivindicación 77.

79. Un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste de las SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:15, y SEQ ID NO:17.

80. Un polinucleótido el cual se hibridiza a un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, ó SEQ ID NO:60 bajo estrictas condiciones de hibridización.

81. Un vector el cual comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 78-80.

82. Un método de inhibir la angiogénesis en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un antagonista de la Notch2 y/o Notch3 humanas.

83. El método de reivindicación 82, el cual es un método de inhibición de la angiogénesis mediante la modulación de la función de los pericitos y/o células de músculo liso vascular.

84. El método de la reivindicación 82 u 83, en donde la angiogénesis es la angiogénesis tumoral.

85. El método de cualquiera de las reivindicaciones 82 a la 84, en donde el antagonista es un anticuerpo.

86. El método de cualquiera de las reivindicaciones 82 a la 84, en donde el antagonista no es un anticuerpo.

87. El método de cualquiera de las reivindicaciones 82 a la 86, en donde el antagonista es un antagonista de la Notch3 humana.

88. El método de la reivindicación 87, en donde el antagonista también es un antagonista de la Notch2 humana.

89. El método de cualquiera de las reivindicaciones 82 a la 88, que además comprende administrar al sujeto un antagonista del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del VEGF.

RESUMEN

El presente invento se relaciona con agentes fijadores de Notch y antagonistas de la proteína Notch y métodos para el uso de los agentes y/o antagonistas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. El presente invento suministra anticuerpos los cuales se fijan de manera específica a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de uno o más receptores Notch humanos, como Notch2 y/o Notch3, e inhiben el crecimiento tumoral. El presente invento además suministra métodos para tratar el cáncer, los métodos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo el cual se fija de manera específica a una región no fijadora de ligandos del dominio extracelular de una proteína receptora Notch humana e inhibe el crecimiento tumoral.

Figure 1A

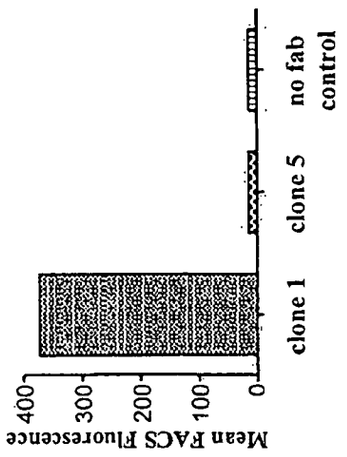


Figure 1B

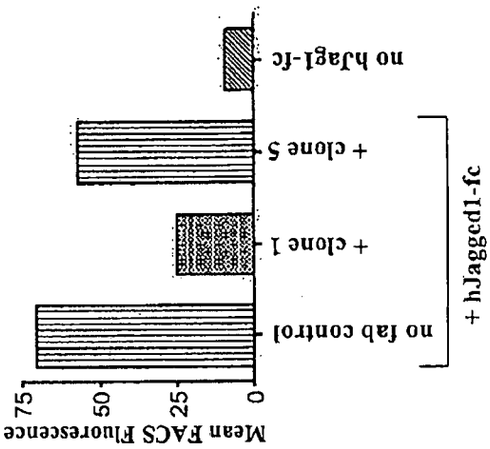


Figure 1D

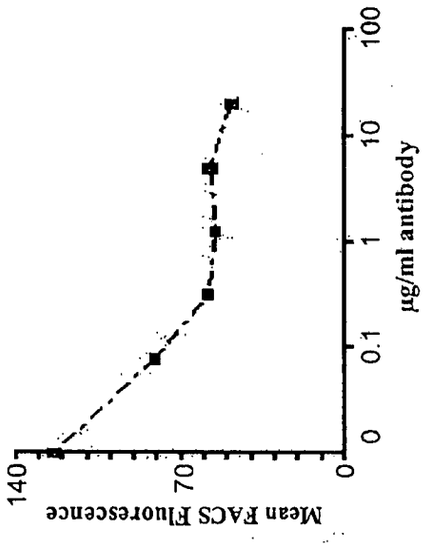


Figure 1C

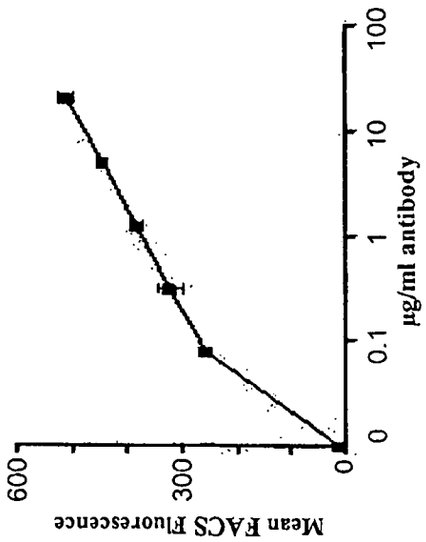
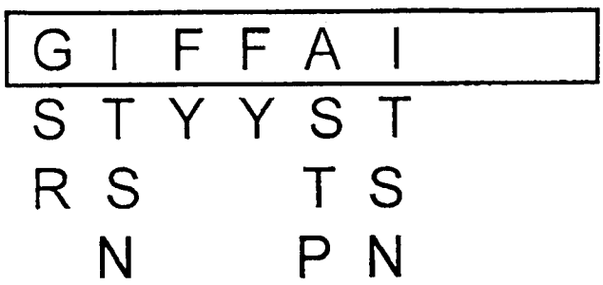


Figure 1E



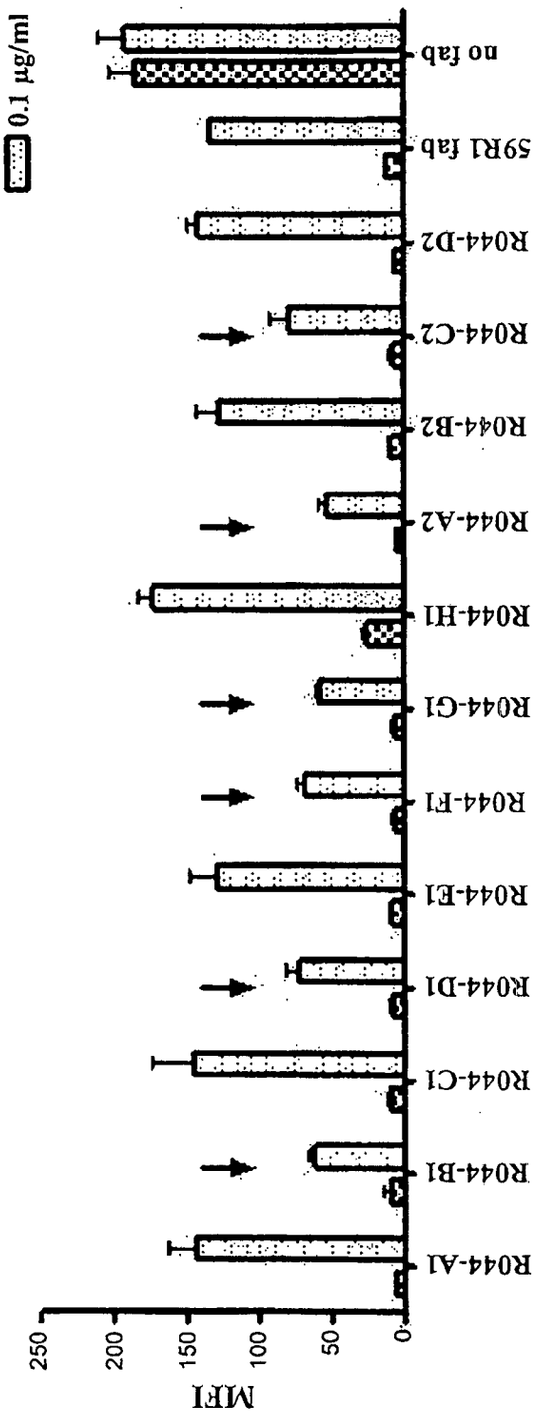

10 µg/ml
0.1 µg/ml
no fab
59R1 fab
R044-D2
R044-C2
R044-B2
R044-A2
R044-H1
R044-G1
R044-F1
R044-E1
R044-D1
R044-C1
R044-B1
R044-A1
0
50
100
150
200
250
MFI

Figure 1F

Figure 2

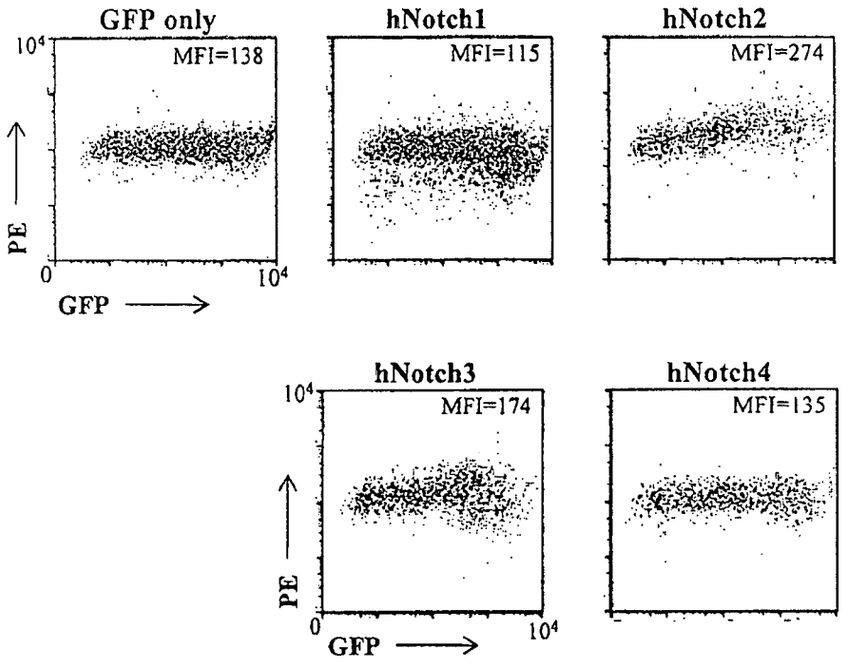
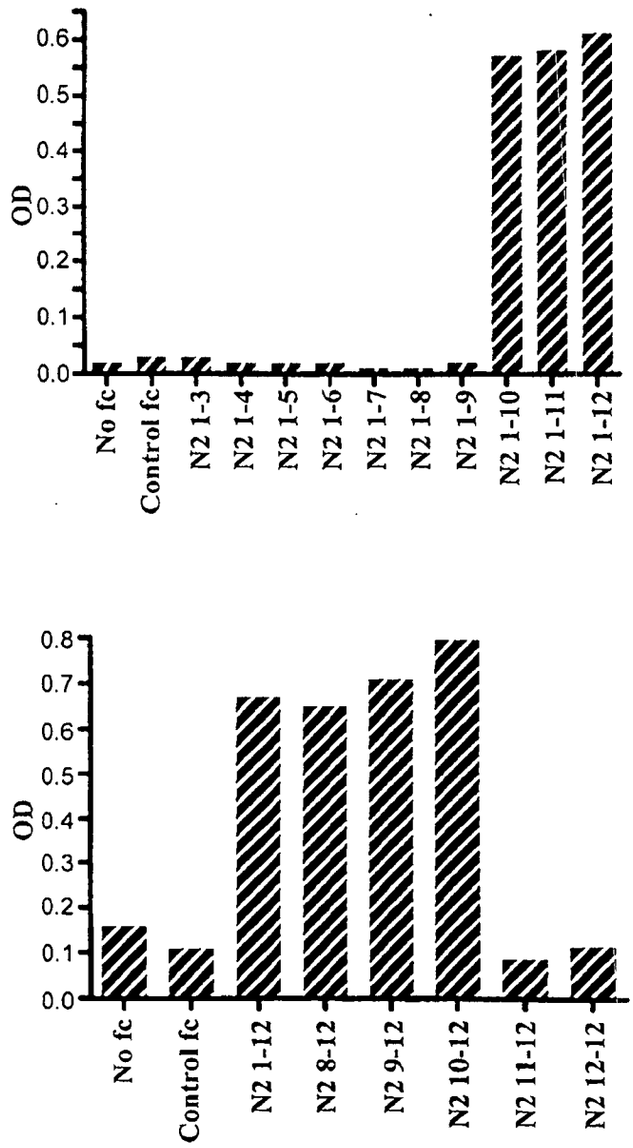

GFP only
MFI=138
hNotch1
MFI=115
hNotch2
MFI=274
hNotch3
MFI=174
hNotch4
MFI=135
PE
GFP
0
10^4

Figure 3A


OD
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
No fc
Control fc
N2 1-3
N2 1-4
N2 1-5
N2 1-6
N2 1-7
N2 1-8
N2 1-9
N2 1-10
N2 1-11
N2 1-12
OD
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
No fc
Control fc
N2 1-12
N2 8-12
N2 9-12
N2 10-12
N2 11-12
N2 12-12

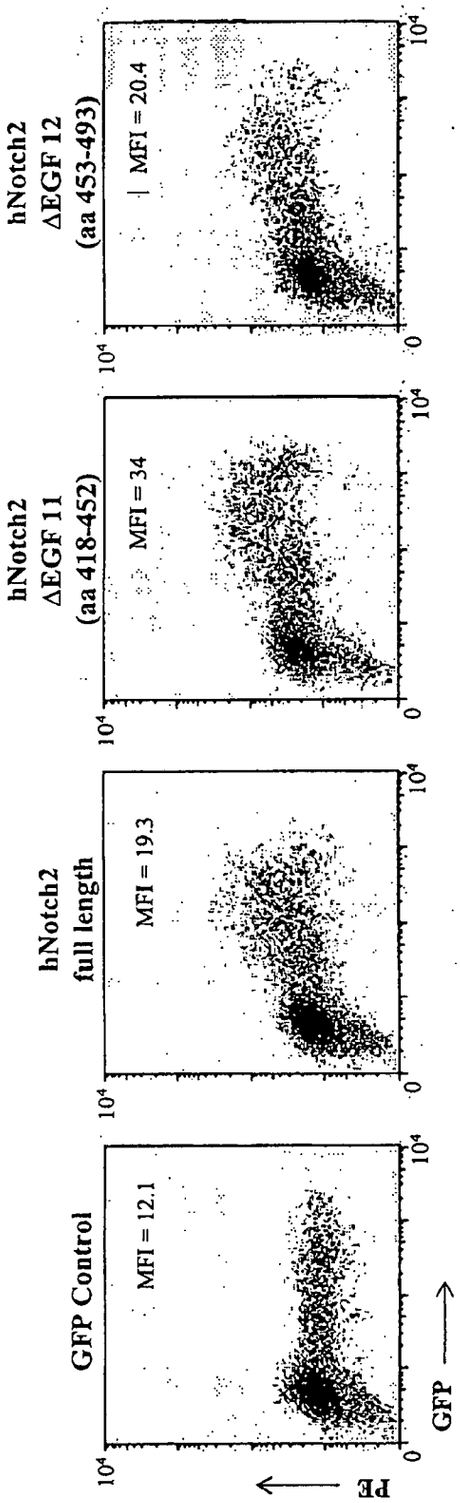

GFP Control
MFI = 12.1
hNotch2
full length
MFI = 19.3
hNotch2
ΔEGF 11
(aa 418-452)
MFI = 34
hNotch2
ΔEGF 12
(aa 453-493)
MFI = 20.4
PE
GFP
10^4
0

Figure 3B

Figure 3C

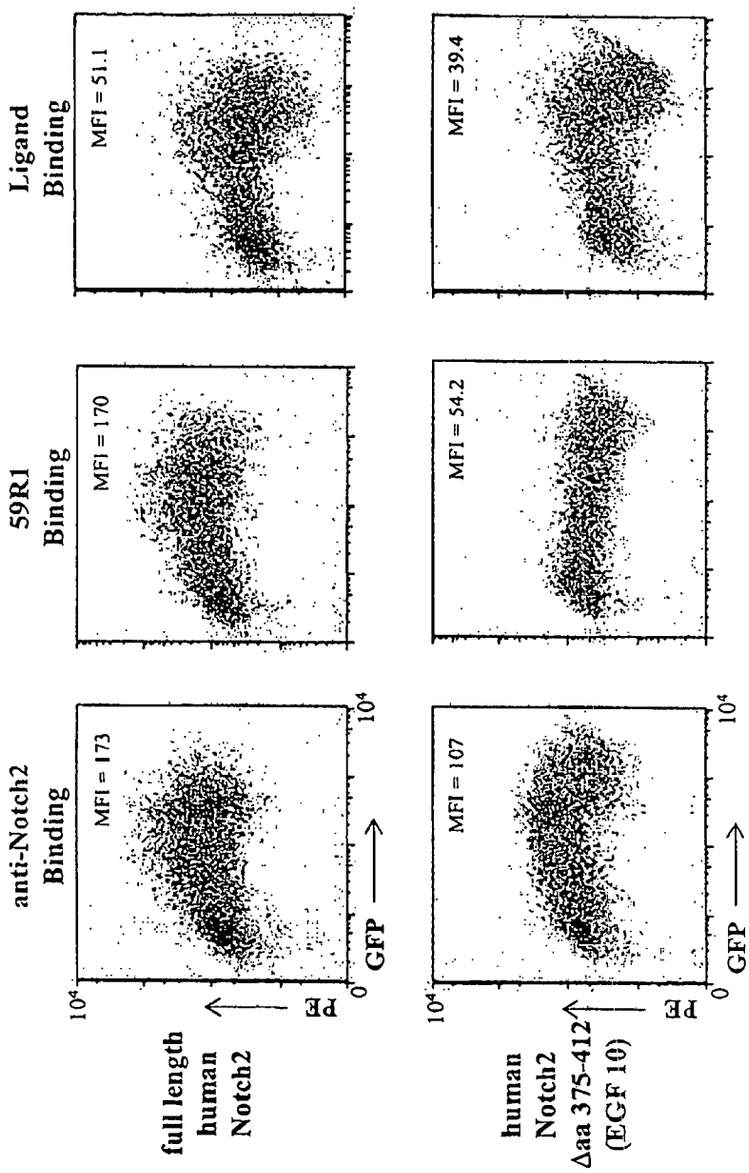

anti-Notch2 Binding
59R1 Binding
Ligand Binding
MFI = 173
MFI = 170
MFI = 51.1
MFI = 107
MFI = 54.2
MFI = 39.4
full length human Notch2
human Notch2 Δaa 375-412 (EGF 10)
PE
GFP
10^4
0

Figure 4A

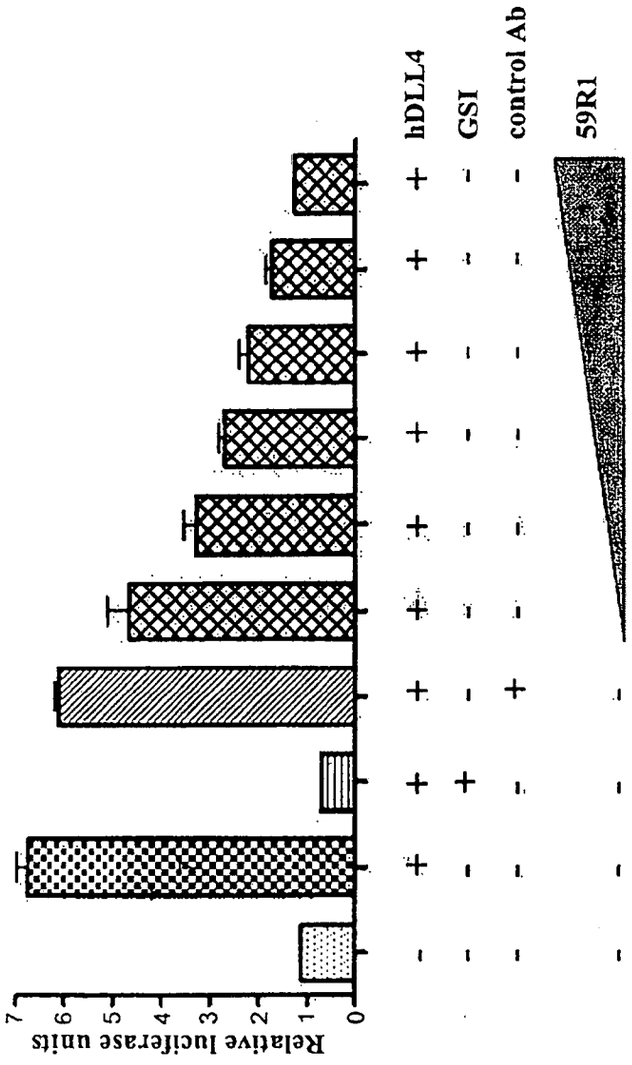

Relative luciferase units
0
1
2
3
4
5
6
7
hDLL4
GSI
control Ab
59R1

Figure 4B

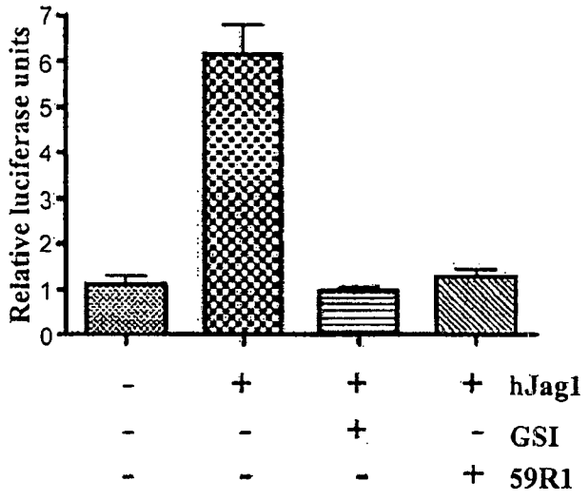


Figure 4C

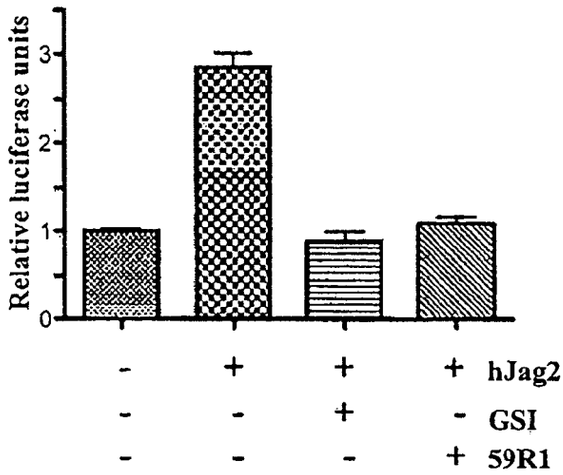


Figure 5A

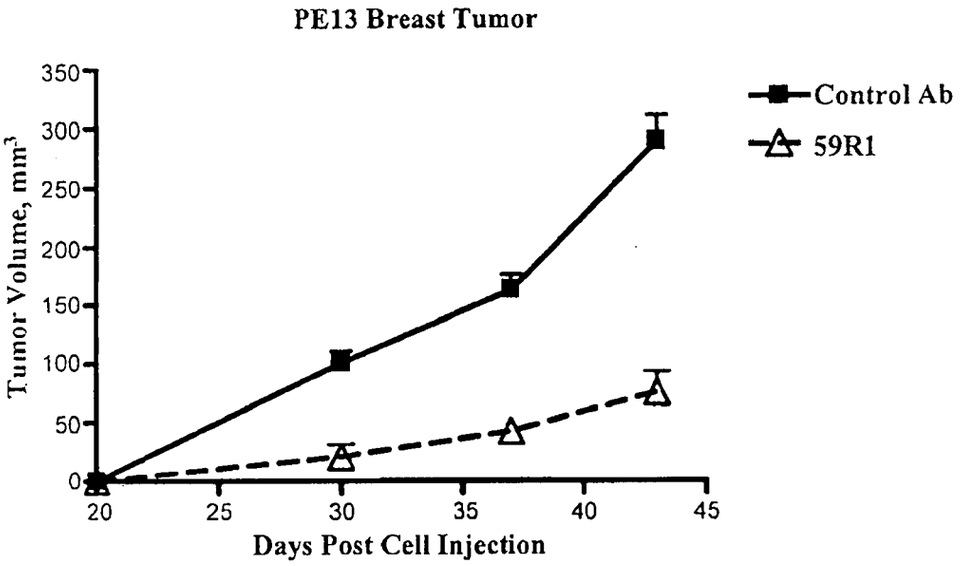

PE13 Breast Tumor
Tumor Volume, mm3
350
300
250
200
150
100
50
0
20
25
30
35
40
45
Days Post Cell Injection
Control Ab
59R1

Figure 5B

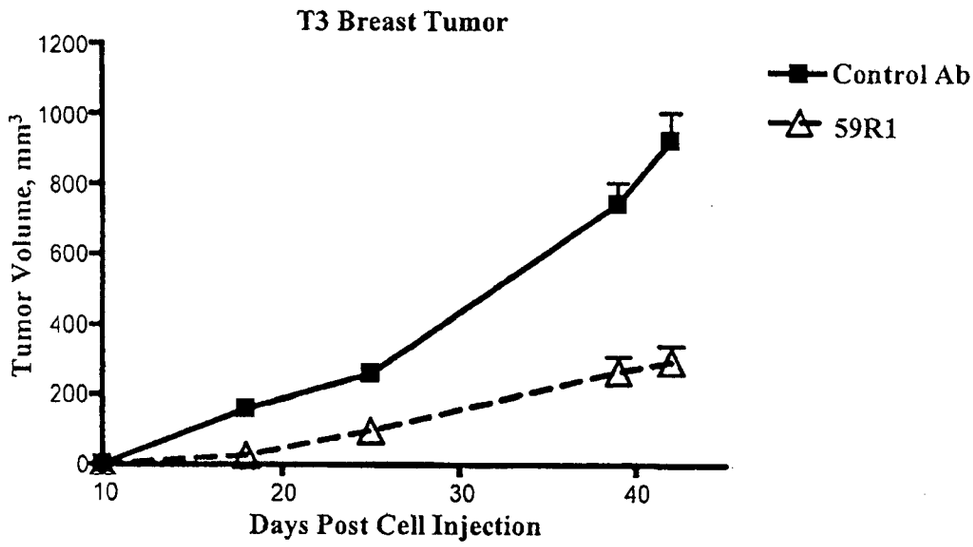
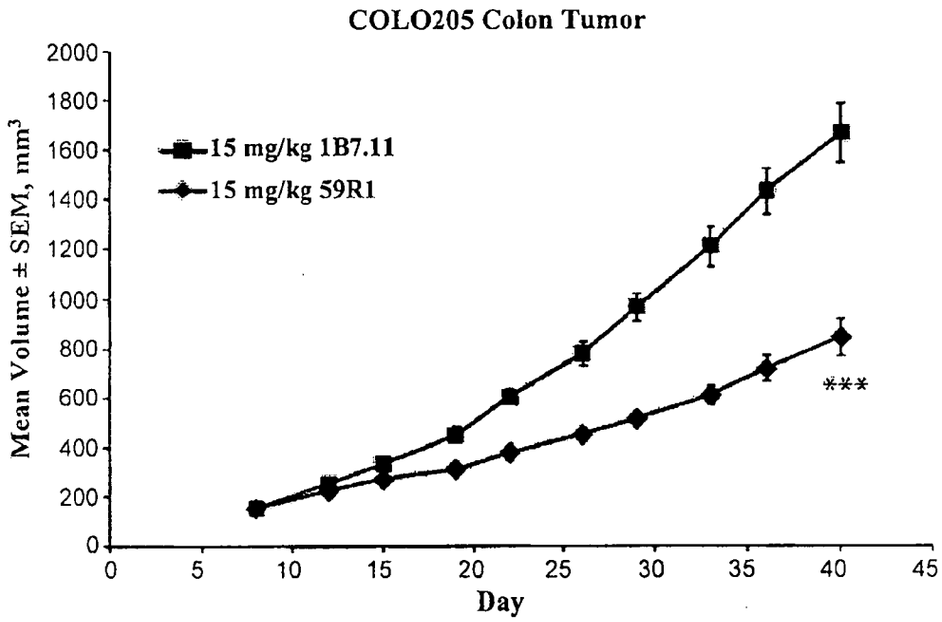
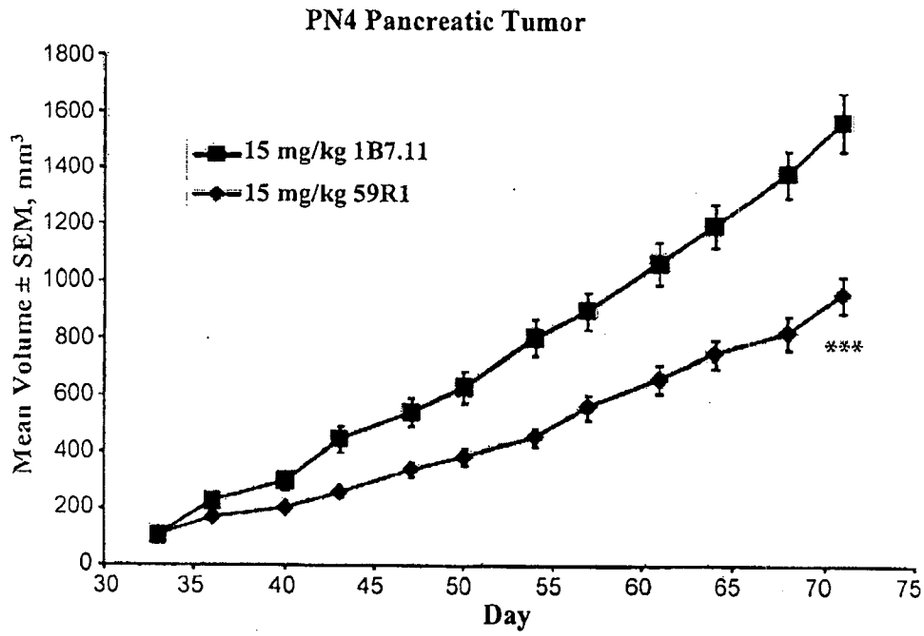

T3 Breast Tumor
Tumor Volume, mm3
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
Days Post Cell Injection
Control Ab
59R1

Figure 5C



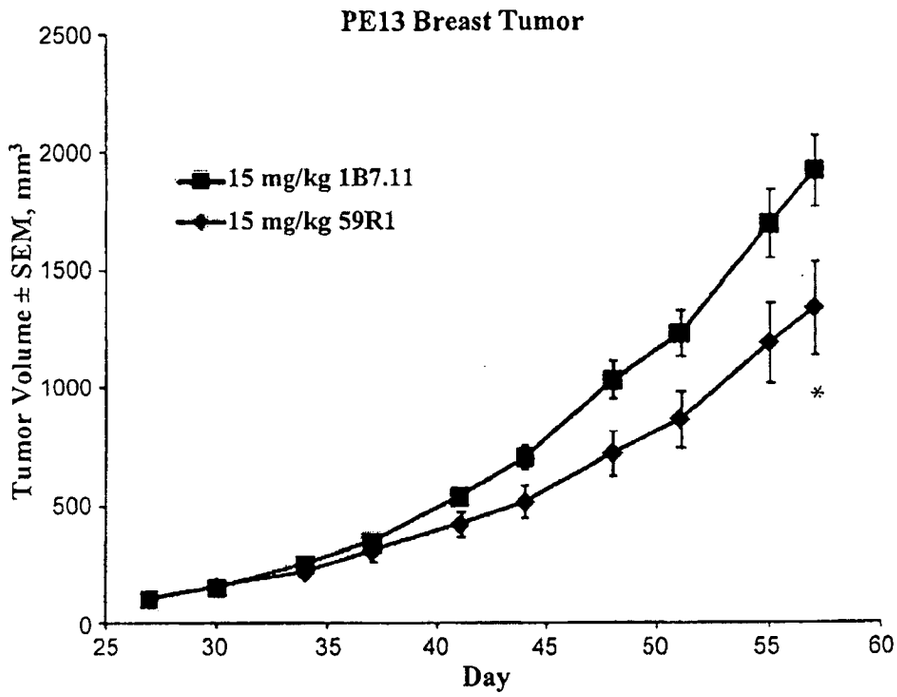
*** $p < 0.001$, 59R1 relative to 1B7.11

Figure 5D



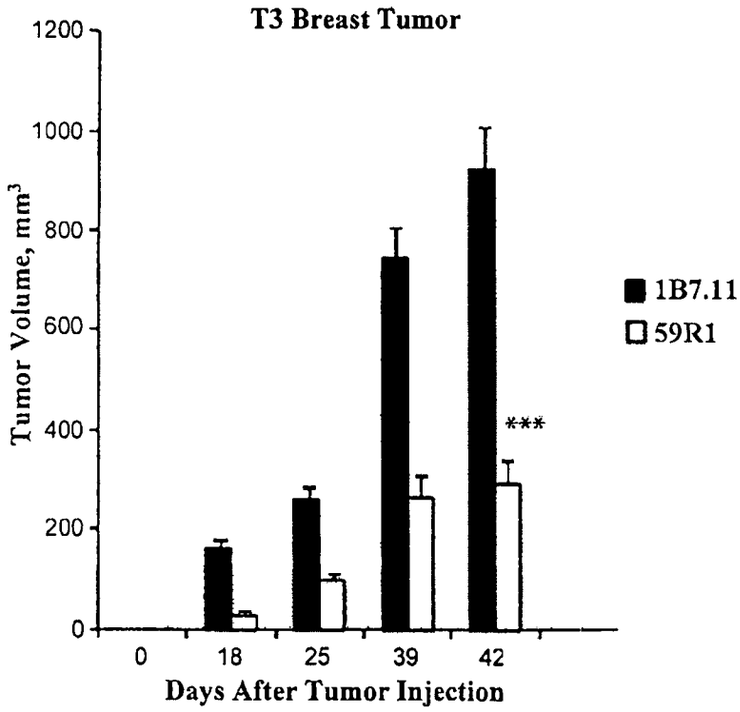
*** $p < 0.001$, 59R1 relative to 1B7.11

Figure 5E



* $p < 0.05$, 59R1 relative to 1B7.11

Figure 5F



*** p < 0.001, 59R1 relative to 1B7.11

Figure 6

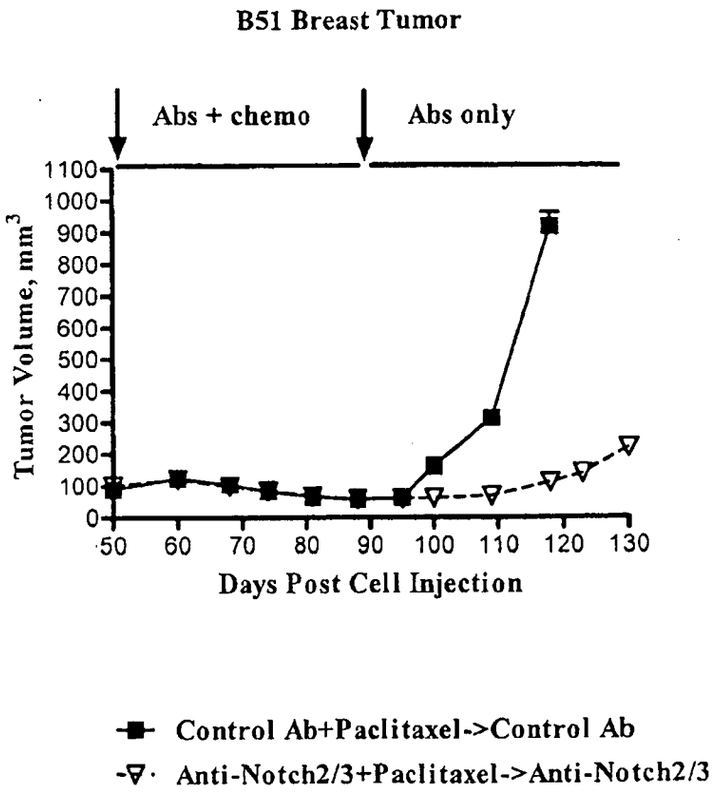

B51 Breast Tumor
Abs + chemo
Abs only
Tumor Volume, mm3
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Days Post Cell Injection
Control Ab+Paclitaxel->Control Ab
Anti-Notch2/3+Paclitaxel->Anti-Notch2/3

Figure 7

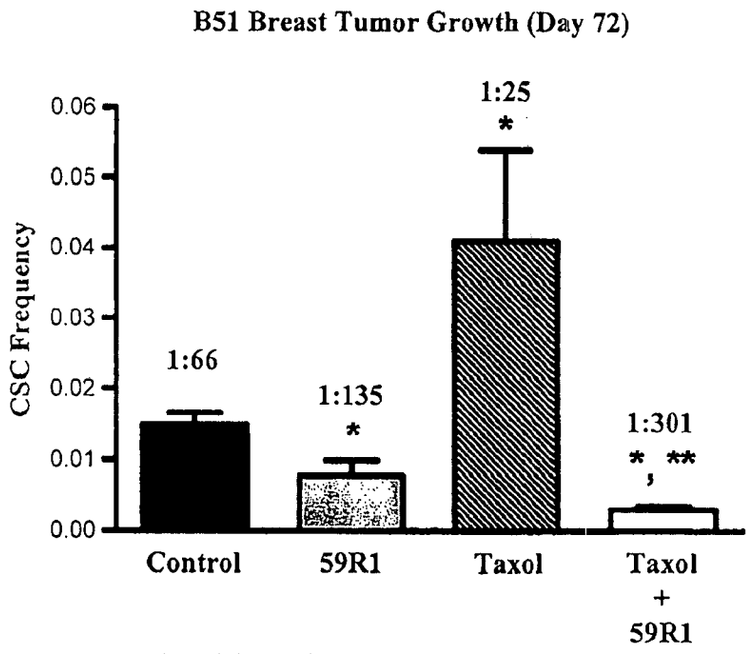

B51 Breast Tumor Growth (Day 72)
CSC Frequency
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
1:66
1:135
*
1:25
*
1:301
*, **
Control
59R1
Taxol
Taxol
+
59R1
*p < 0.05 vs. Control
**p < 0.05 vs. Taxol

Figure 8

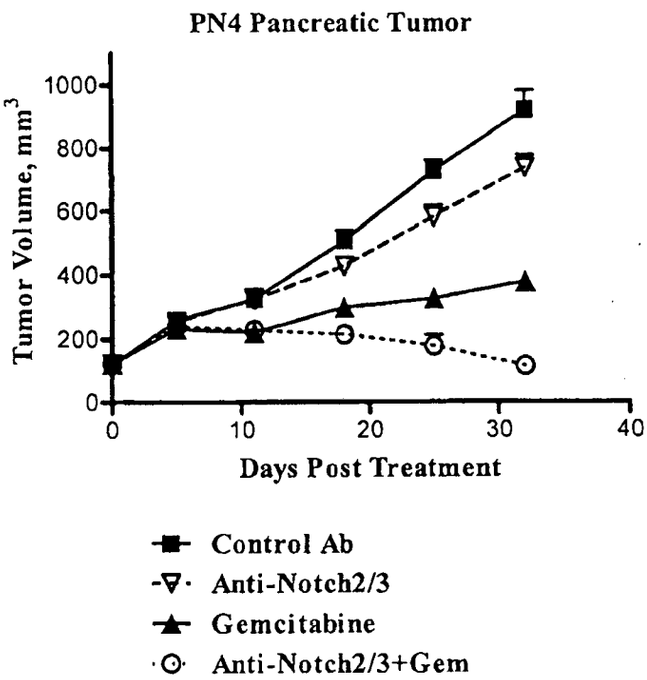

PN4 Pancreatic Tumor
Tumor Volume, mm3
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Days Post Treatment
Control Ab
Anti-Notch2/3
Gemcitabine
Anti-Notch2/3+Gem

Figure 9

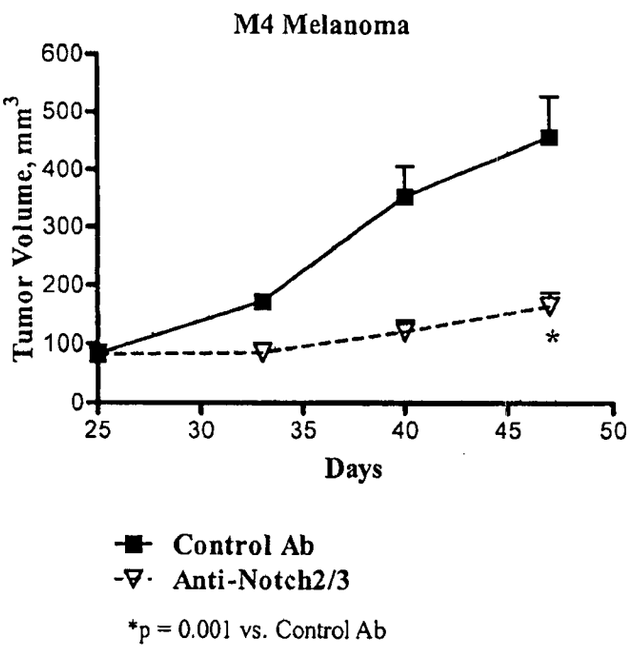
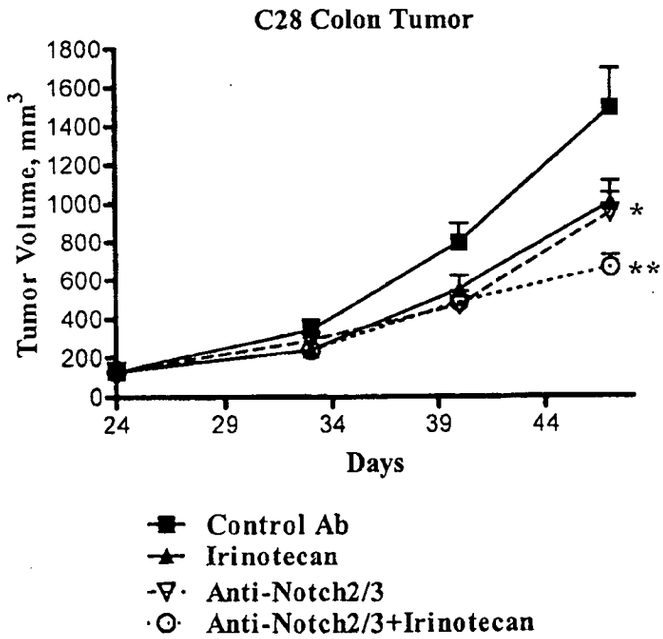

M4 Melanoma
Tumor Volume, mm3
600
500
400
300
200
100
0
25
30
35
40
45
50
Days
*
Control Ab
Anti-Notch2/3
*p = 0.001 vs. Control Ab

Figure 10



*p = 0.03 vs. Control Ab
**p = 0.01 vs. Irinotecan

Figure 11A

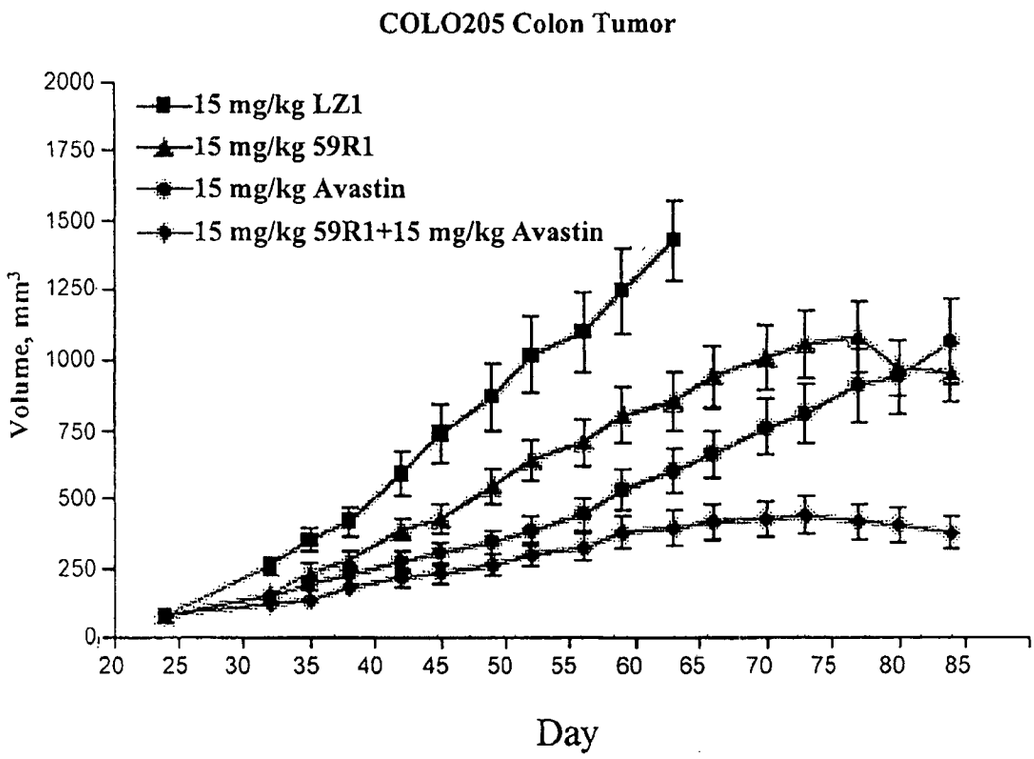

COLO205 Colon Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
15 mg/kg Avastin
15 mg/kg 59R1+15 mg/kg Avastin
Volume, mm3
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
Day

Figure 11B

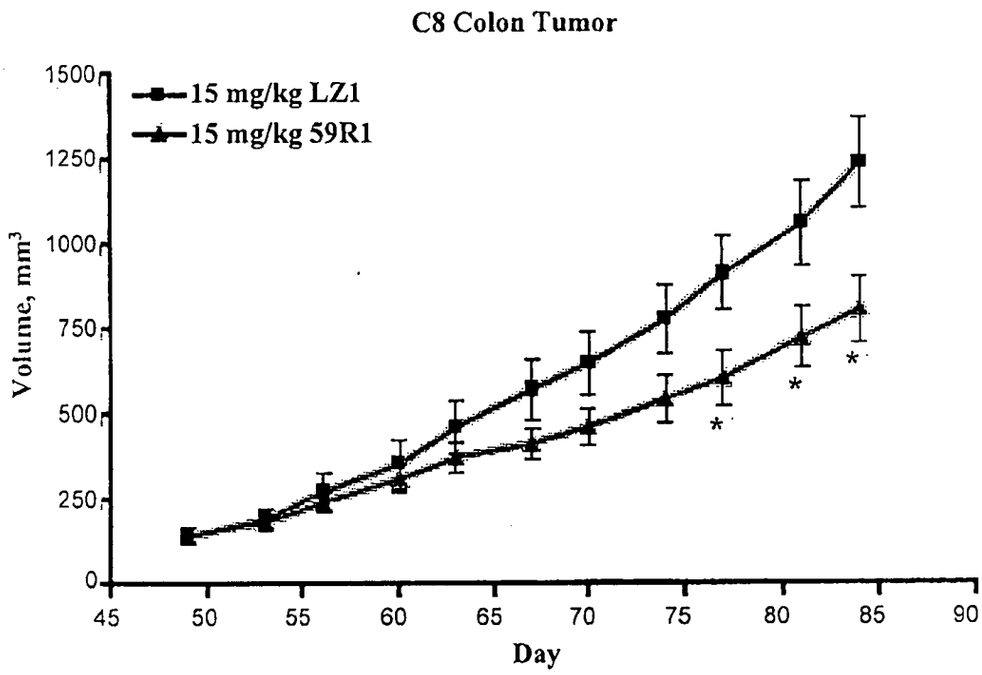
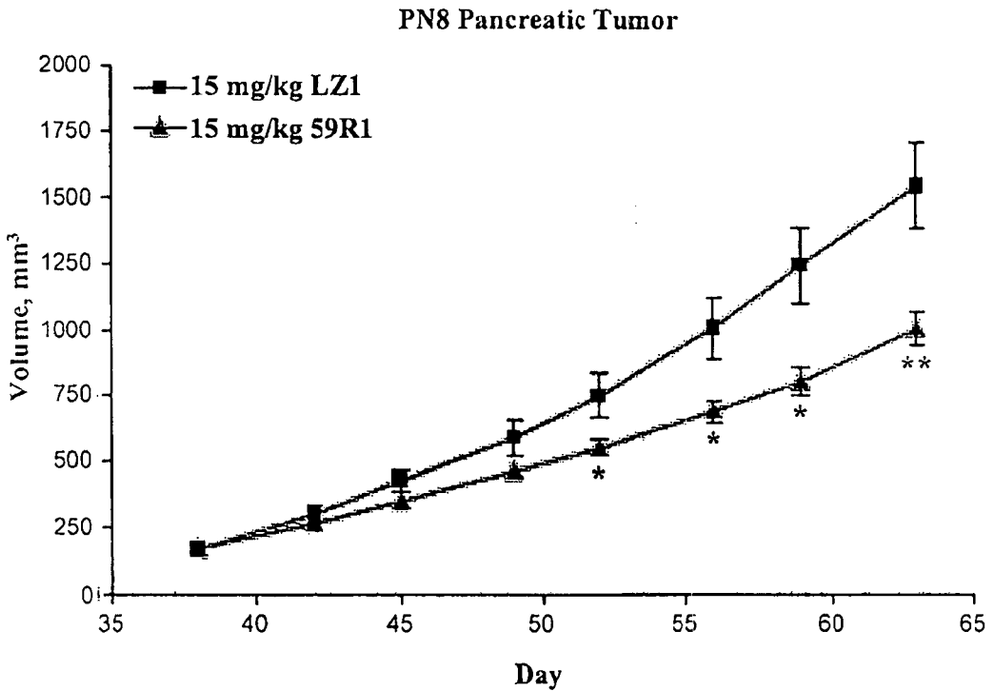

C8 Colon Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
1500
1250
1000
750
500
250
0
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
Day
*
*
*

Figure 11C


PN8 Pancreatic Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
Day
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
35
40
45
50
55
60
65
*
*
*
**

191

Figure 11D

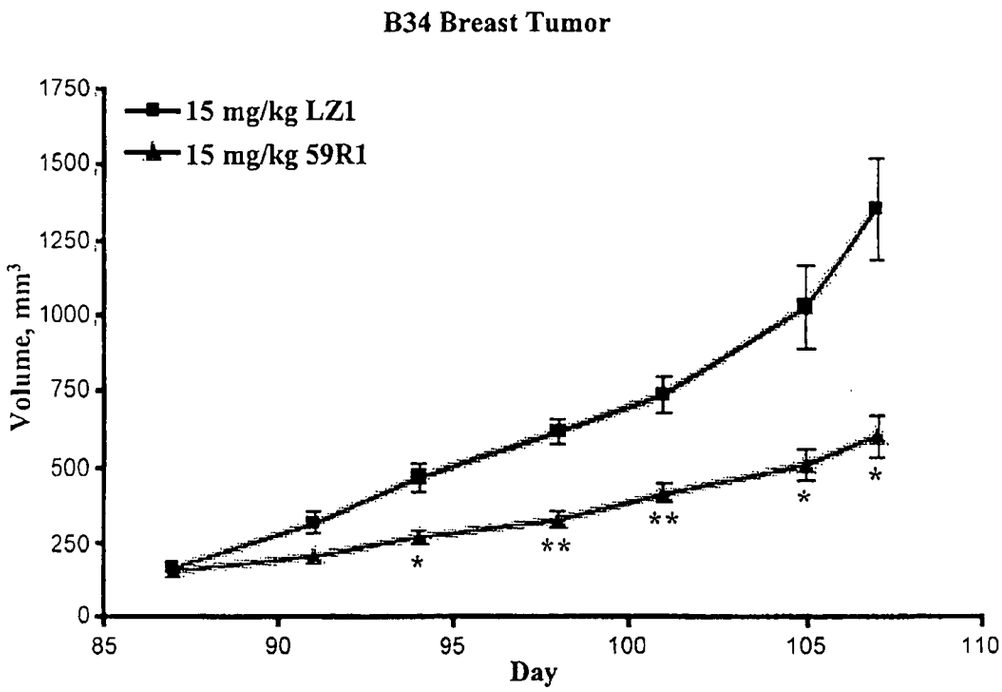


Figure 11E

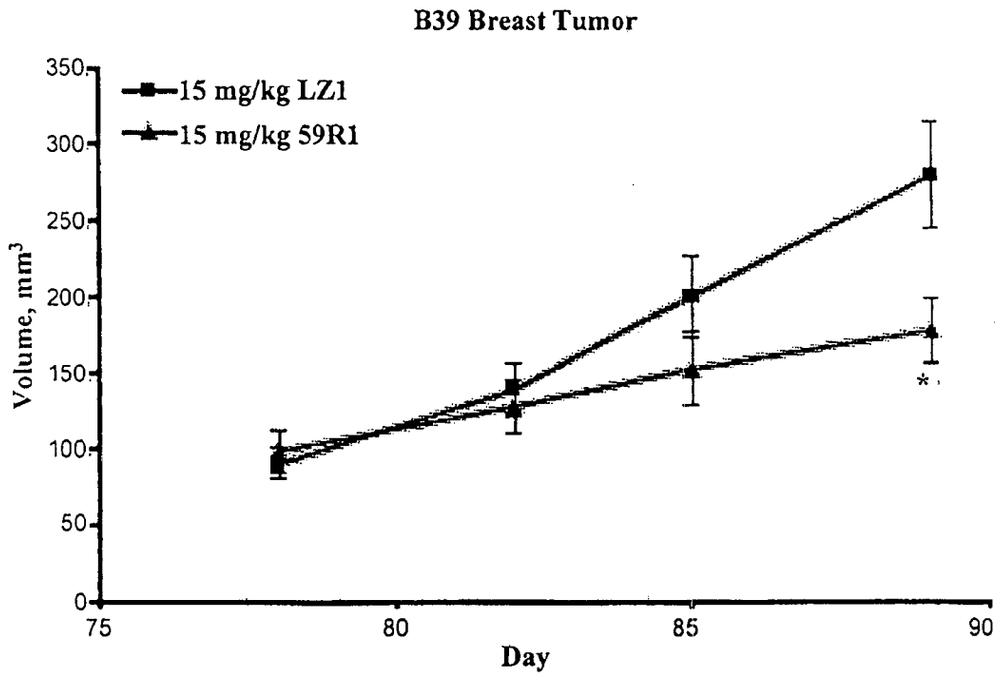

B39 Breast Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
350
300
250
200
150
100
50
0
75
80
85
90
Day
*

Figure 11F

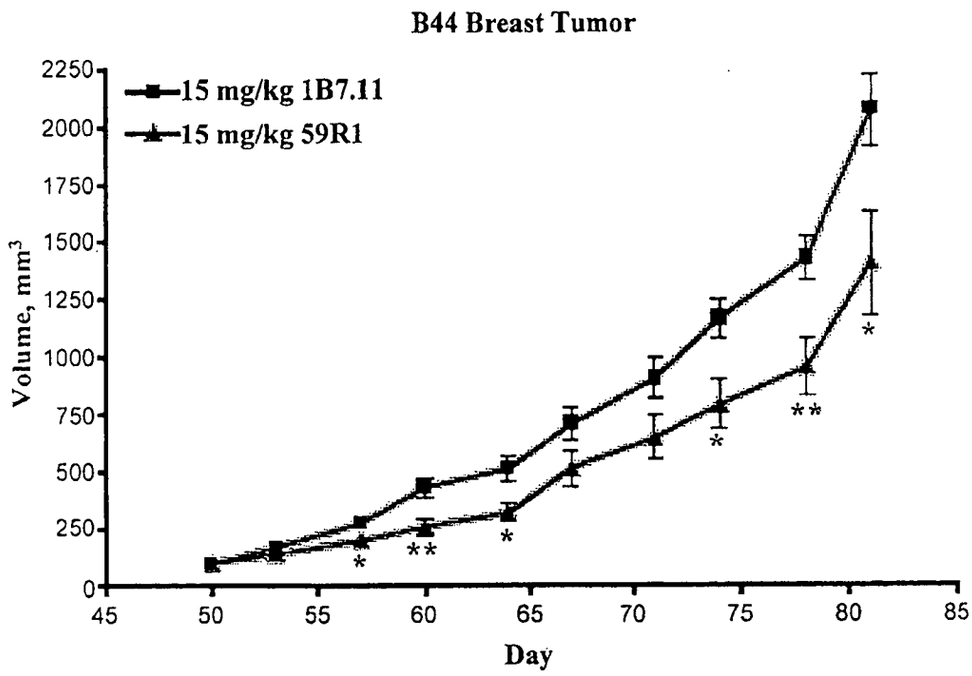

B44 Breast Tumor
15 mg/kg 1B7.11
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
Day
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
45
50
55
60
65
70
75
80
85
*
**
*
*
**
*

Figure 11G

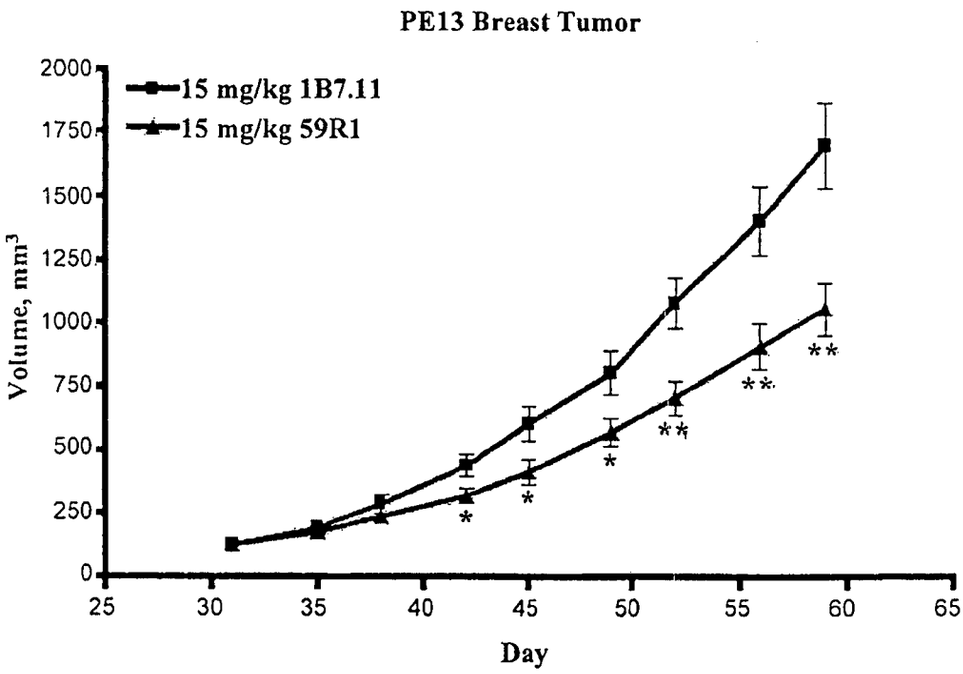

PE13 Breast Tumor
15 mg/kg 1B7.11
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
25
30
35
40
45
50
55
60
65
Day
*
*
*
**
**
**

Figure 11H

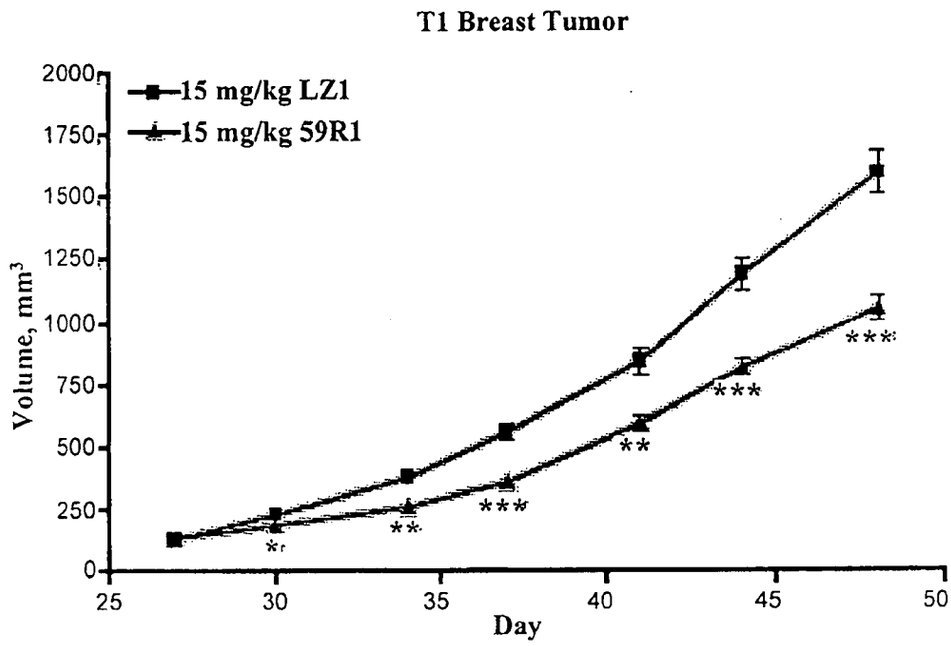

T1 Breast Tumor
15 mg/kg LZ1
15 mg/kg 59R1
Volume, mm3
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
25
30
35
40
45
50
Day
*
**
***
**
***
***

Figure 12A

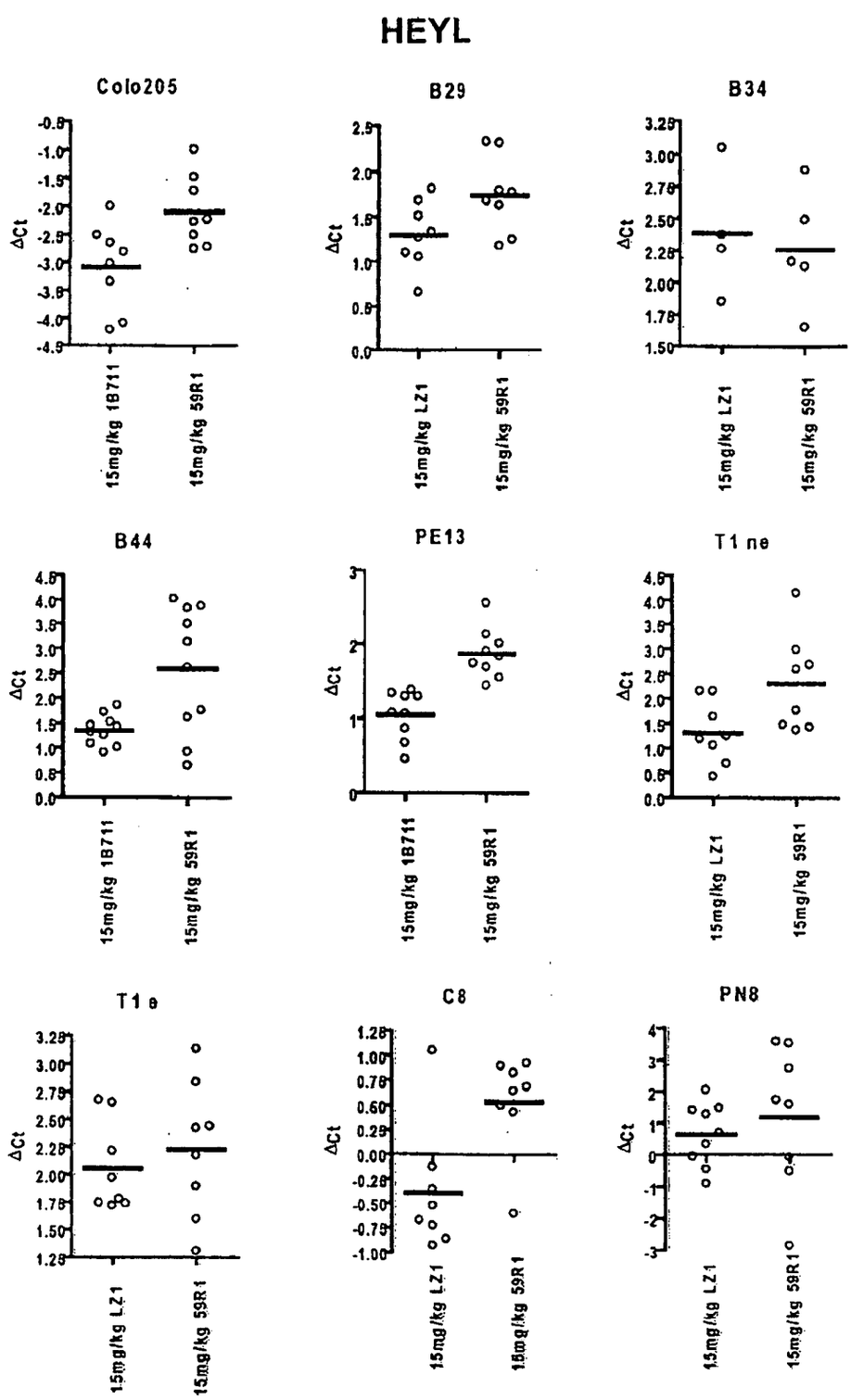

HEYL
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg 59R1
15mg/kg LZ1

Figure 12B

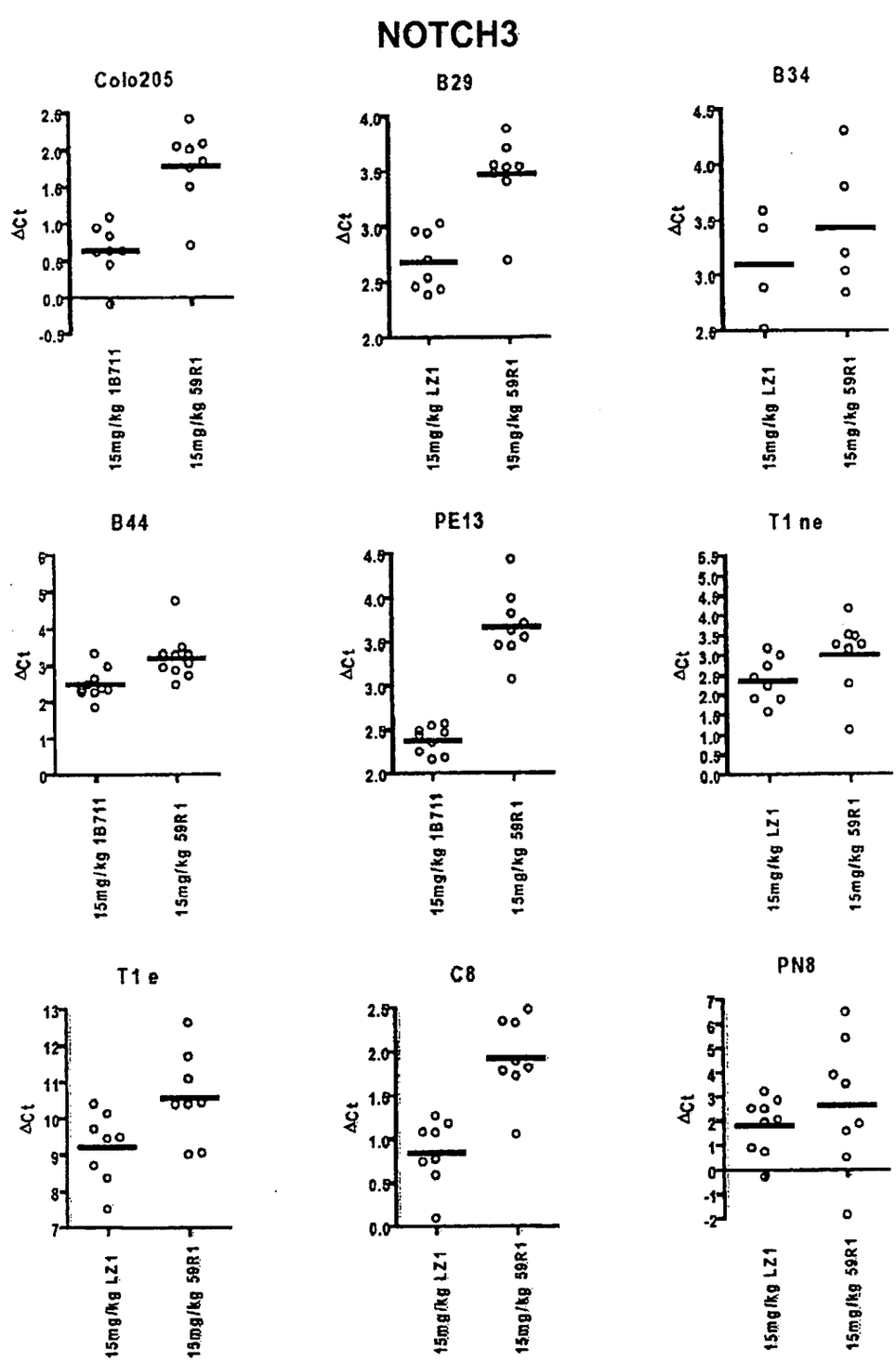

NOTCH3
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg LZ1
15mg/kg 59R1

Figure 12C

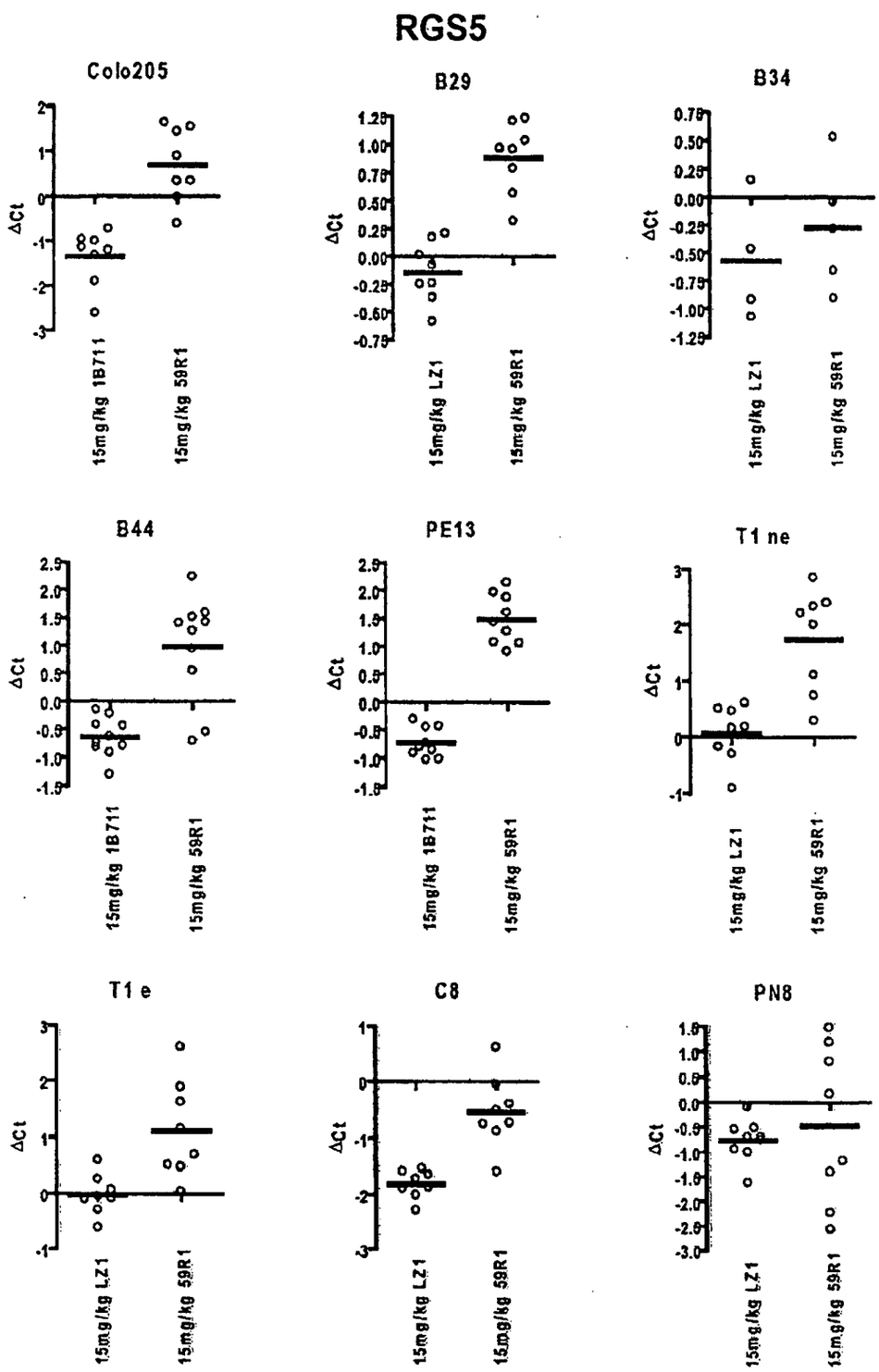

RGS5
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg 59R1
15mg/kg LZ1

Figure 12D

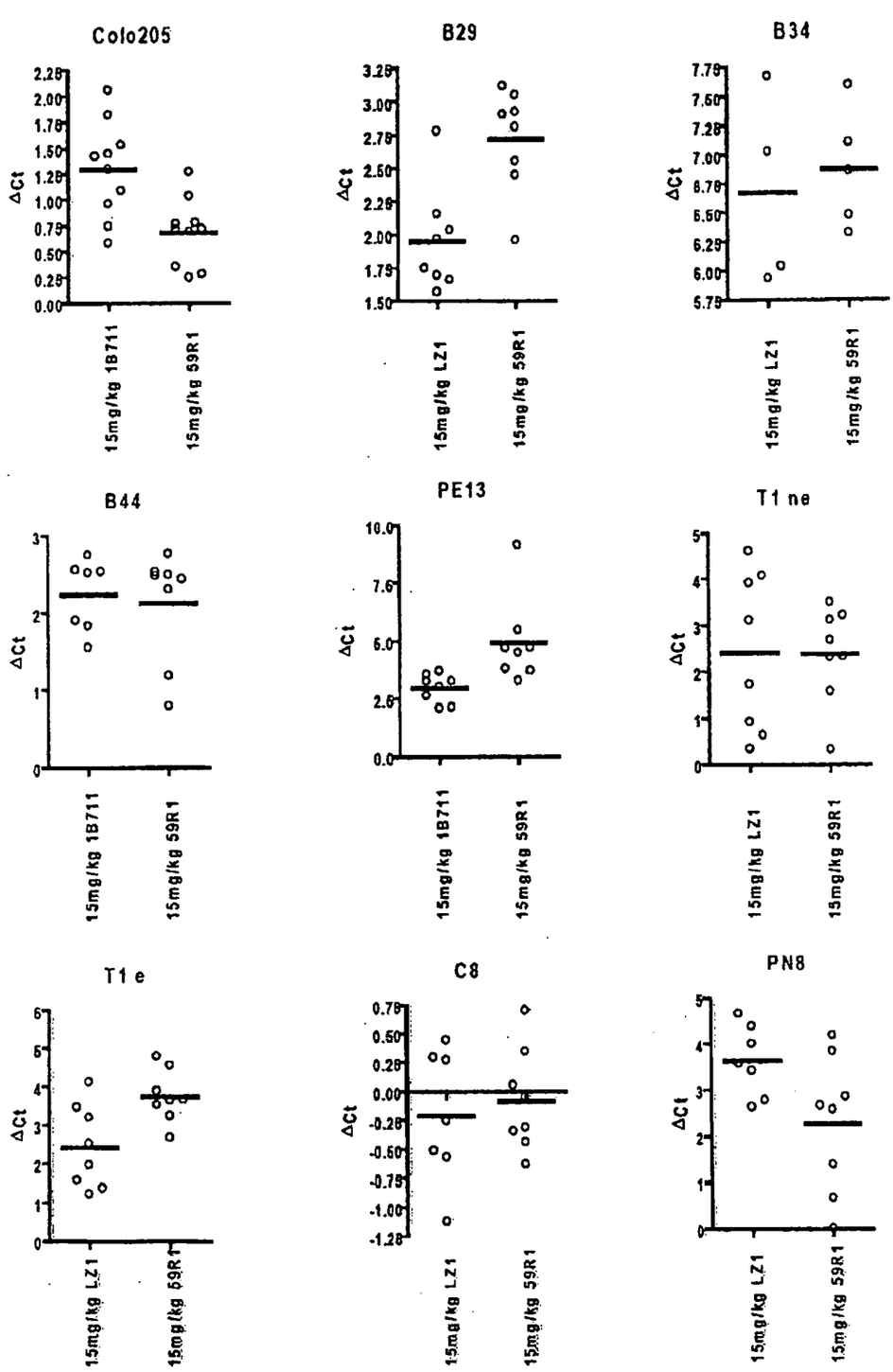

ANGPT1
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg LZ1
15mg/kg 59R1

Figure 12E

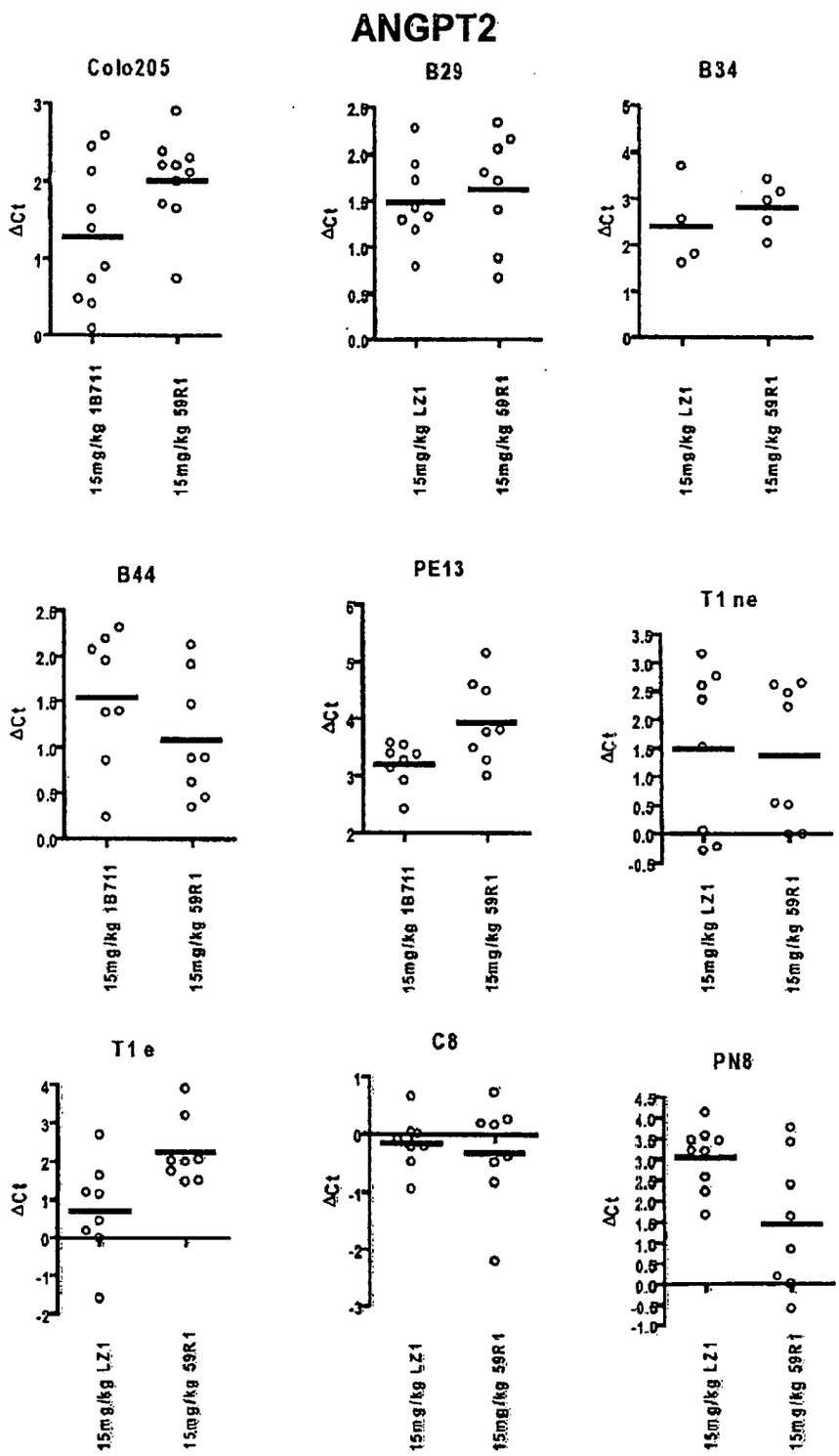

ANGPT2
Colo205
B29
B34
B44
PE13
T1 ne
T1 e
C8
PN8
ΔCt
15mg/kg 1B711
15mg/kg LZ1
15mg/kg 59R1

Figure 13

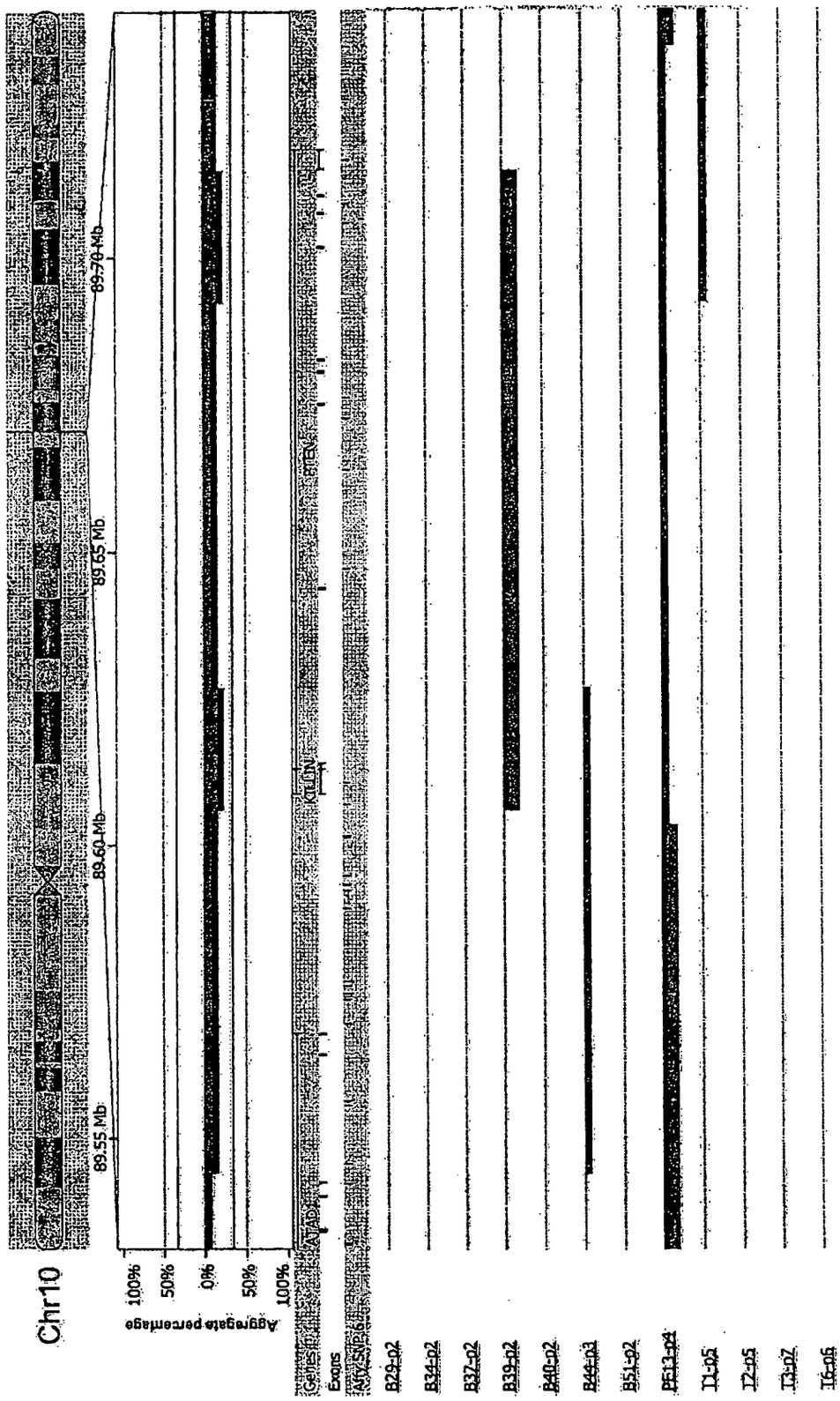

Chr10
89.55 Mb
89.60 Mb
89.65 Mb
89.70 Mb
Aggregate percentage
100%
50%
0%
50%
100%
Genes
ATAD1
KLF6
PTEN
KLF6
Exons
Any SNP
B29-p2
B34-p2
B32-p2
B39-p2
B40-p2
B44-p3
B51-p2
PE13-p4
T1-p5
T2-p5
T3-p7
T6-p6

Figure 14

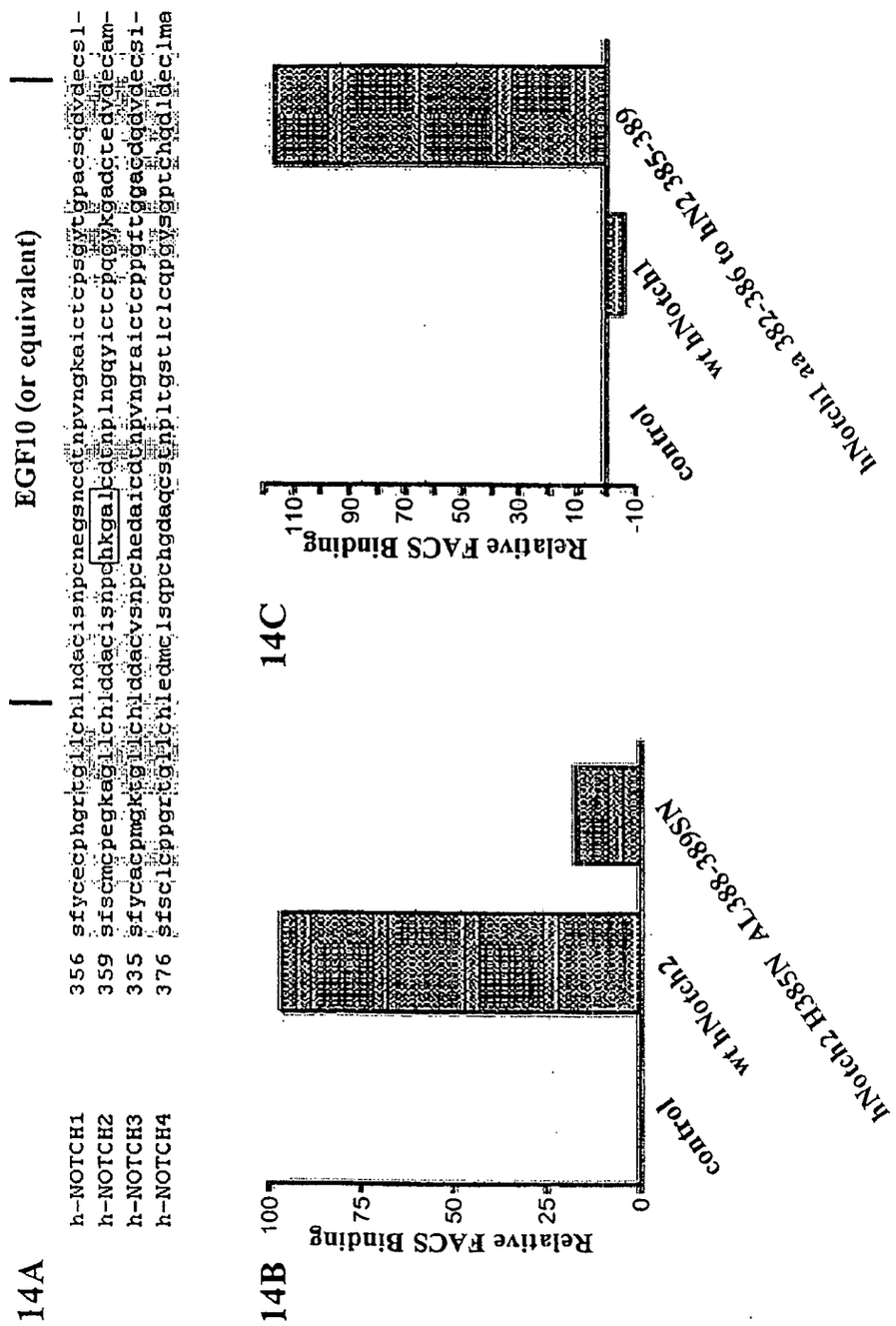

14A
EGF10 (or equivalent)
h-NOTCH1 356 sfycecphgrtglchlndacisnpcnegsncdtnpvngkaicttcpsgytgpacsqdvdecsl-
h-NOTCH2 359 sfscmcpegkaglchlddacisnpchkgalcdcnplngqyicttcpqgykgadctedvdecam-
h-NOTCH3 335 sfycacpmgktglchlddacvsnpchedaicdcnpvngraicttcppgftggacdqdvdecsi-
h-NOTCH4 376 sfsclcppgrtglchledmclsqpchgdaqcsrnpltgstclclcqpgysgptchqdldeclma
14B
Relative FACS Binding
100
75
50
25
0
control
wt hNotch2
hNotch2 H385N A1388-389SN
14C
Relative FACS Binding
110
90
70
50
30
10
-10
control
wt hNotch1
hNotch1 aa 382-386 to hN2 385-389

Figure 15A

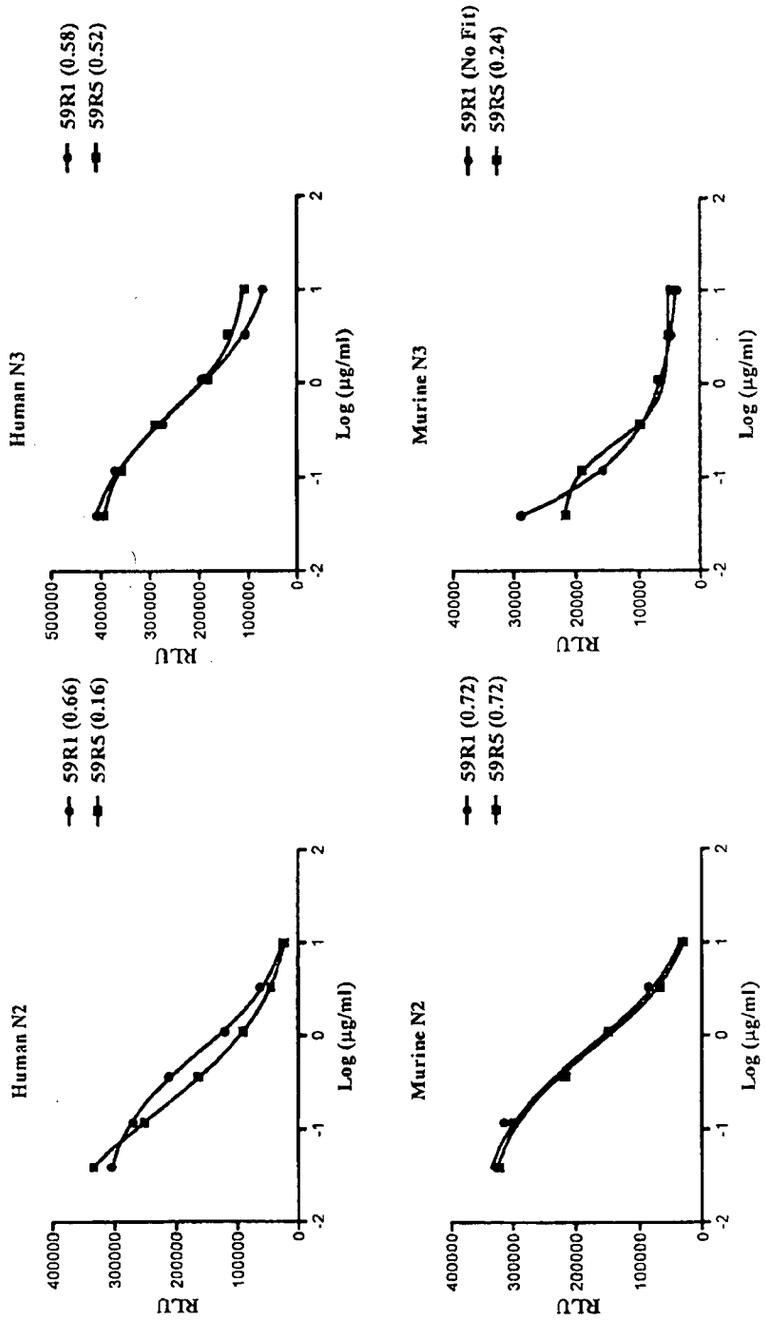

Human N3
59R1 (0.58)
59R5 (0.52)
RLU
Log (µg/ml)
Murine N3
59R1 (No Fit)
59R5 (0.24)
RLU
Log (µg/ml)
Human N2
59R1 (0.66)
59R5 (0.16)
RLU
Log (µg/ml)
Murine N2
59R1 (0.72)
59R5 (0.72)
RLU
Log (µg/ml)

Figure 15B

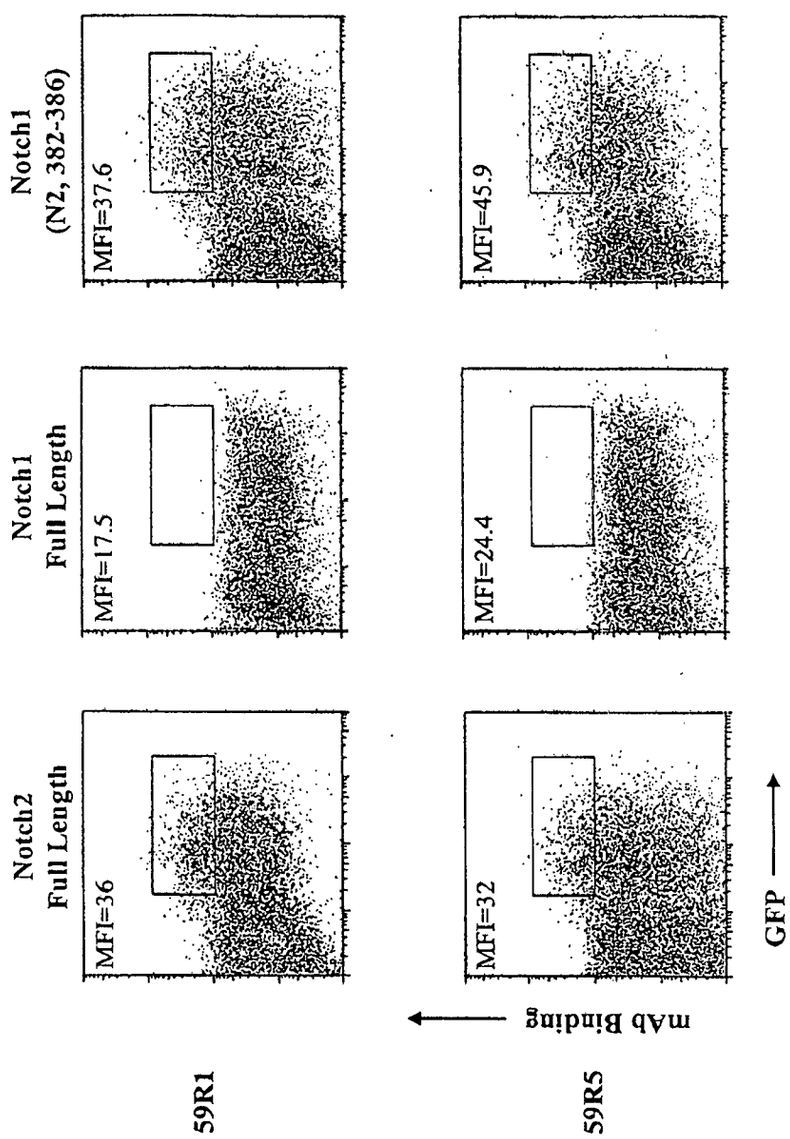
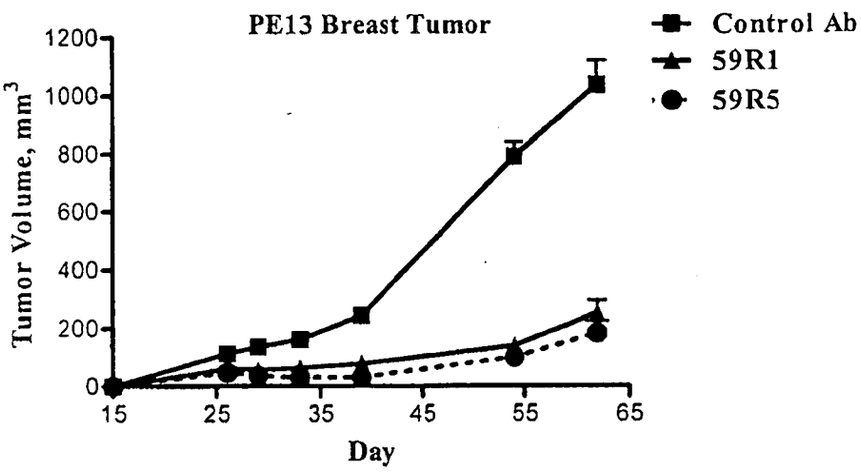

Notch1
(N2, 382-386)
MFI=37.6
MFI=45.9
Notch1
Full Length
MFI=17.5
MFI=24.4
Notch2
Full Length
MFI=36
MFI=32
59R1
59R5
mAb Binding
GFP

Figure 16

16A



16B

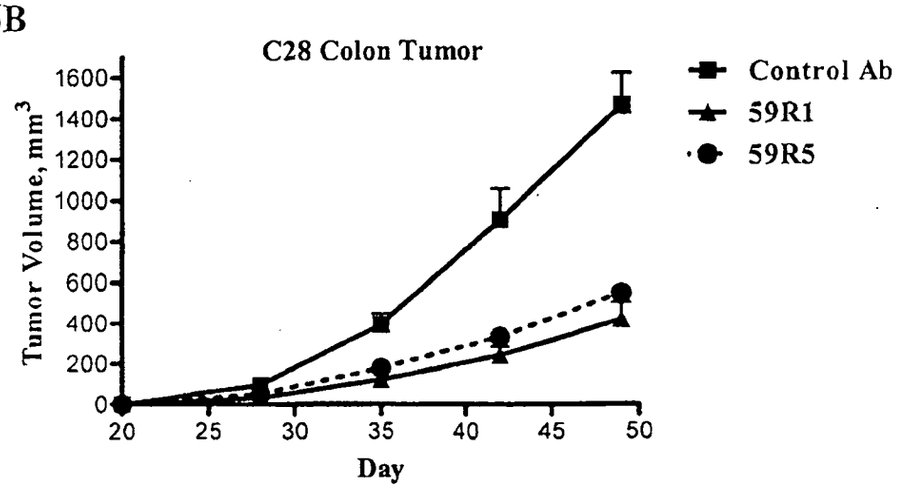


Figure 16

16C

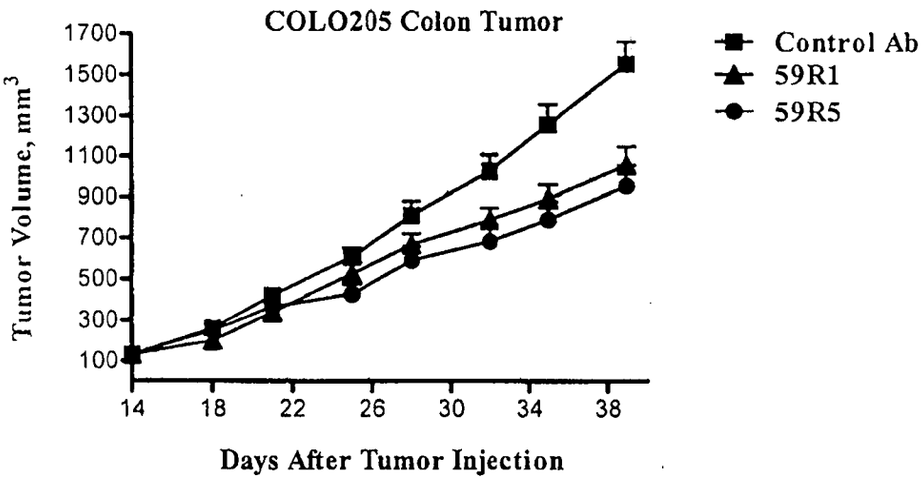
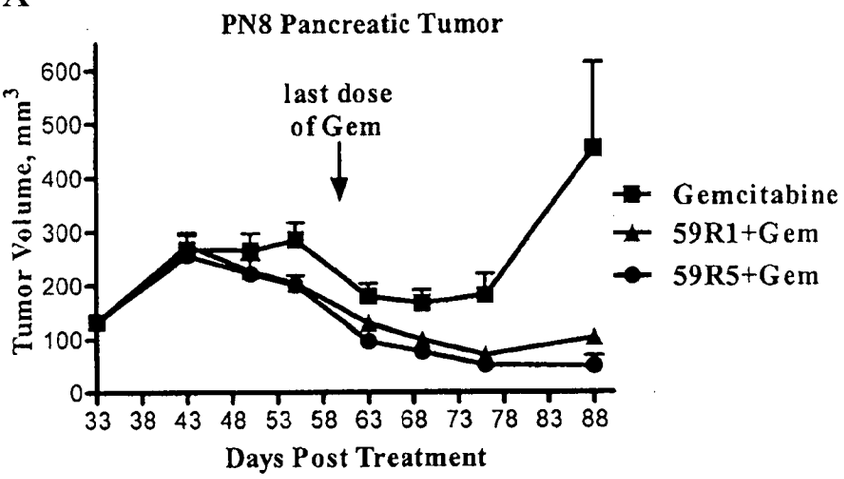


Figure 17

17A



17B

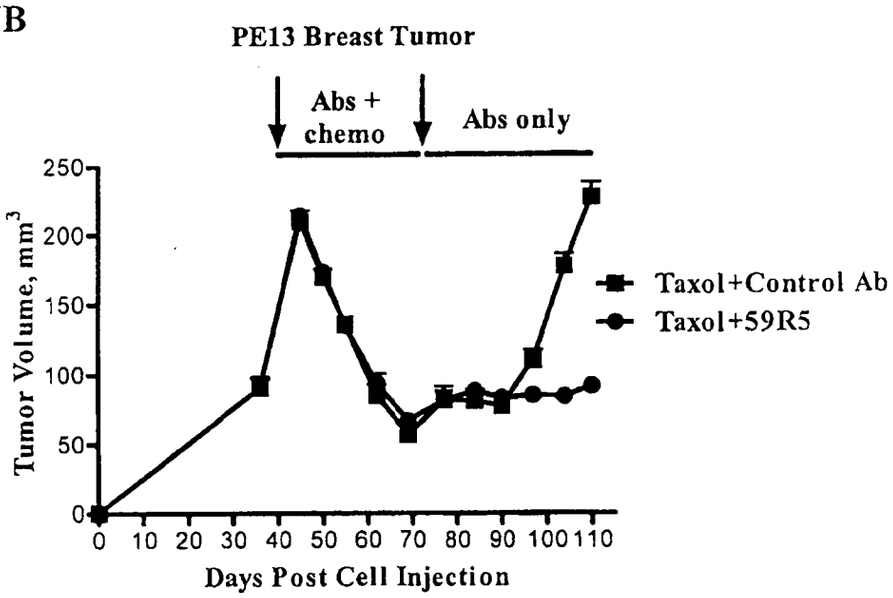
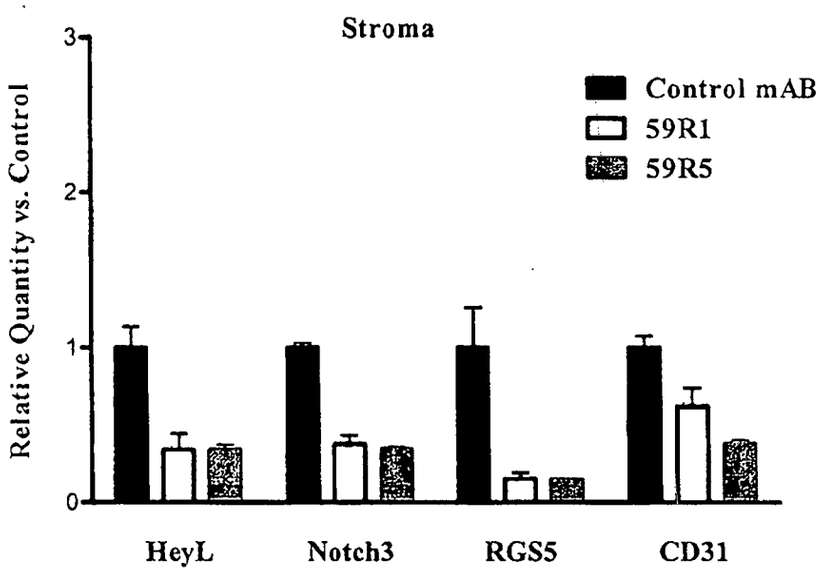


Figure 18


Stroma
Control mAB
59R1
59R5
Relative Quantity vs. Control
0
1
2
3
HeyL
Notch3
RGS5
CD31

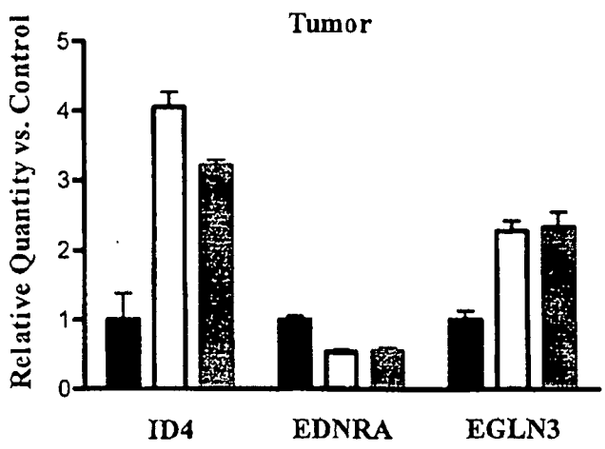
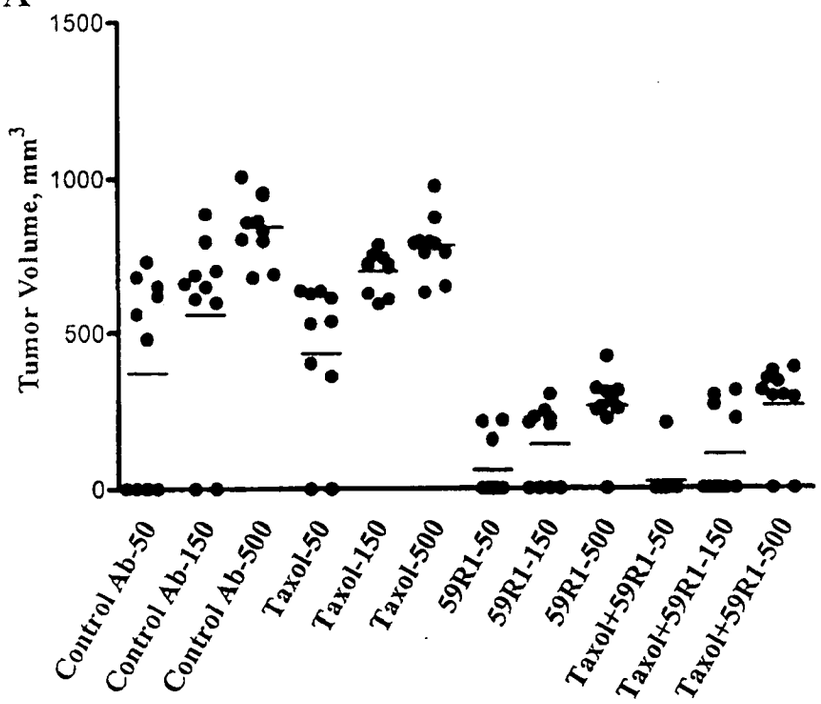

Tumor
Relative Quantity vs. Control
0
1
2
3
4
5
ID4
EDNRA
EGLN3

Figure 19

19A



19B

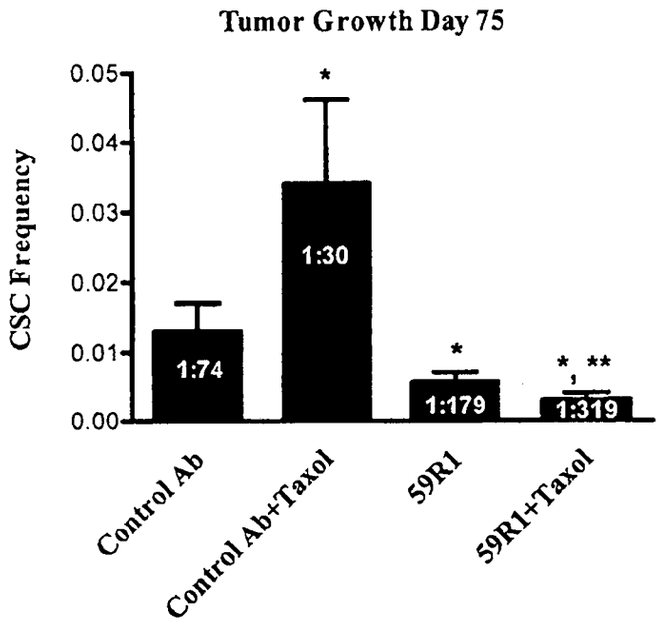
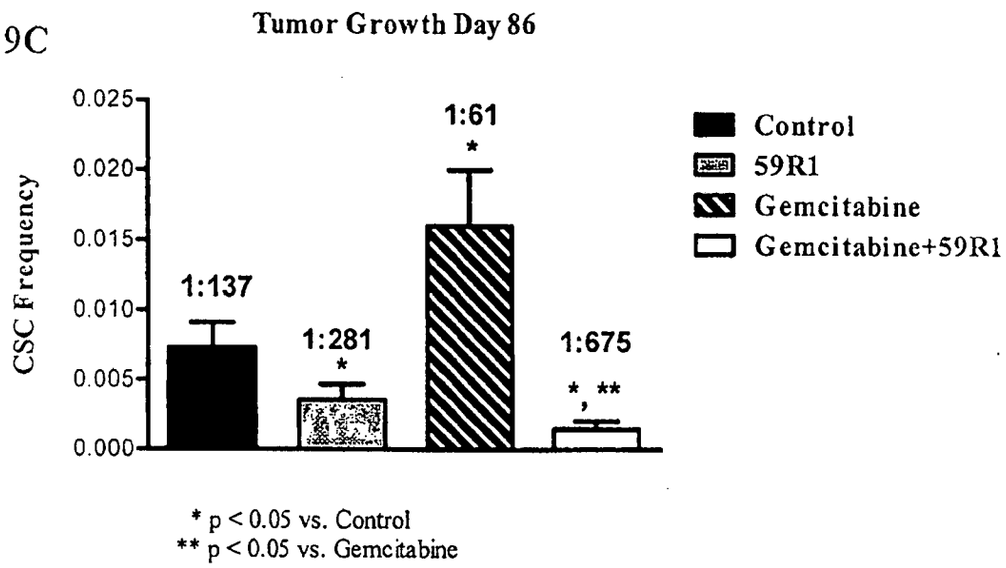


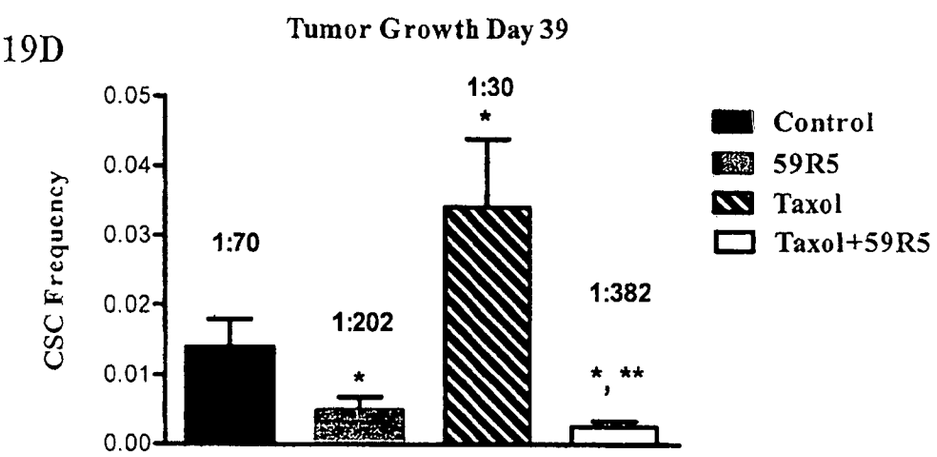
Figure 19

19C



* p < 0.05 vs. Control
** p < 0.05 vs. Gemcitabine

19D



* p < 0.05 vs. Control
** p < 0.05 vs. Taxol

ATCC®

10801 University Boulevard • Manassas, VA 20110-2209 USA • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-334-2932

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)
OncoMed Pharmaceuticals
Austin Gurney
800 Cheaseapeake Drive
Redwood City, CA 94063
Deposited on Behalf of: OncoMed Pharmaceuticals

Date of Receipt of Cultures by the ATCC®: October 15, 2008

Identification Reference by Depositor:	ATCC® Patent Deposit Designation:	
Bacterial plasmid DNA contains a synthetic DNA insert	59R1	PTA-9547
Bacterial plasmid DNA contains a synthetic DNA insert	52R43	PTA-9548
Bacterial plasmid DNA contains a synthetic DNA insert	52M51H4L3	PTA-9549

The deposits were received by this International Depository Authority and have been accepted.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC® is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

We will inform you of requests for the strains for 30 years from date of deposit.

The deposits were tested October 22, 2008 and on that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Latha Ramakrishnan

Digitally signed by Latha Ramakrishnan
DN: cn=Latha Ramakrishnan, o=ATCC, ou=IP,Licensing and Services, email=lramakrishnan@atcc.org, c=US
Date: 2008.10.23 11:55:48 -04'00'

ATCC ® Patent Depository

October 23, 2008
Date

cc: Stern, Kessler,Goldstein and Fox
Ref: Docket or Case No.: OMP-49PROV1

BP4/9

ATCC®

A global bioscience nonprofit organization dedicated to biological standards and biodiversity

IP, Licensing and Services
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 USA
Telephone: (800) 638-6597
Facsimile: (703) 334-2932
Internet: http://www.atcc.org

102

BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

To: Austin Gurney
OncoMed Pharmaceuticals Inc
800 Chesapeake Drive
Redwood City, CA 94063

Deposited on Behalf of: **OncoMed Pharmaceuticals Inc**

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: **July 06, 2009**

Identification Reference by Depositor:		ATCC ®Patent Deposit Designation:
Plasmid isolated from E.coli containing human DNA insert	**59R5**	**PTA-10170**

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.

2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.

ATCC®

A global bioscience nonprofit
organization dedicated to biological
standards and biodiversity

IP, Licensing and Services
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 USA
Telephone: (800) 638-6597
Facsimile: (703) 334-2932
Internet: http://www.atcc.org

The deposit was tested **July 15, 2009** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Latha Ramakrishnan

Digitally signed by Latha Ramakrishnan
DN: cn=Latha Ramakrishnan, o=ATCC, ou=Intellectual Property & Licensing Services, email=lramakrishnan@atcc.org, c=US
Date: 2009.07.16 10:05:46 -04'00'

ATCC® Patent Depository

July 16, 2009
Date

Cc: Stern, Kessler, Goldstein and Fox
Ref: Docket or Case No. : OMP-049NP

AUSTRALIA

The applicant hereby gives notice that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be effected prior to the grant of a patent, or prior to the lapsing, refusal or withdrawal of the application, to a person who is a skilled addressee without an interest in the invention (Regulation 3.25(3) of the Australian Patents Regulations).

CANADA

The applicant hereby requests that, until either a Canadian patent has been issued on the basis of the application or the application has been refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, the furnishing of a sample of deposited biological material referred to in the application only be effected to an independent expert nominated by the Commissioner of Patents.

CROATIA

The applicant hereby requests that a sample of deposited biological material referred to in the application should be made available between the publication of the application and the granting of the patent to an independent expert only. Samples shall be made available only if the person requesting them undertakes, for the term during which the patent is in force, not to make them or any material derived from them available to third parties, and not to use them or any material derived from them except for experimental or research purposes, unless the applicant for or owner of the patent, as applicable, expressly waives such undertaking.

DENMARK

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent office or any person approved by the applicant in the individual case.

FINLAND

The applicant hereby requests that, until the publication of the mention of the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration of Finland or for 20 years from the date of filing if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration of Finland, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the National Board of Patents and Registration of Finland or any person approved by the applicant in the individual case.

GERMANY

The applicant herby requests that, until the grant of a patent or for 20 years from the date of filing of the application is refused or withdrawn, a sample shall only be issued to an independent expert nominated by the applicant.

ICELAND

The applicant hereby requests that, until a patent has been granted or a final decision taken by the Icelandic Patent Office concerning an application which has not resulted in a patent, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Icelandic Patent office or any person approved by the applicant in the individual case.

NORWAY

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent office or any person approved by the applicant in the individual case.

SINGAPORE

The applicant hereby requests that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be made available to an expert.

SPAIN

The applicant hereby requests that, until the publication of the mention of the grant of a Spanish patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, the biological material shall be made available as provided in Article 45 SPL only by the issue of a sample to an independent expert.

SWEDEN

The applicant hereby requests that, until the patent has been granted by the Swedish Patent and Registration Office or if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of the patent, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. The same is applied to rejected or withdrawn applications within a period of 20 years from the filing date.

SWITZERLAND

The applicant hereby requests that, the furnishing of samples to a third party may be subject to the condition that that party indicates to the depository institution its name and address for the purpose of information of the depositor and undertakes: (a) not to make available the deposited culture or a culture derived from it to a third party; (b) not to use the culture outside the purview of the law; (c) to produce, in case of a dispute, evidence that the obligations under items (a) and (b) have not been violated.

THE FORMER YUGOSLAV REPUBLIC OF MACEDONIA

The applicant hereby requests that, the furnishing of samples to a third party may be subject to the condition that that party: (a) has a right to demand that a sample of the viable biological or microbiological material be made available; (b) has undertaken to ensure that the applicant does not authorize access to the sample of the deposited viable biological or microbiological material to any third party before the expiry of the prescribed period of validity of the patent.

UNITED KINGDOM

The applicant hereby requests that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be made available to an expert.

EUROPEAN PATENT OFFICE

The applicant hereby requests that, until the publication of the mention of the grant of a European patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or deemed to be withdrawn, the biological material shall be made available as provided in Rule 28(3) EPC only by the issue of a sample to expert nominated by the requester (Rule 28(4) EPC).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44*bis*)

Applicant's or agent's file reference 2293.049PC03	**FOR FURTHER ACTION**	See item 4 below
International application No. PCT/US2009/003994	International filing date *(day/month/year)* 08 July 2009 (08.07.2009)	Priority date *(day/month/year)* 08 July 2008 (08.07.2008)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 *bis*.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

   In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	Box No. II	Priority
☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐	Box No. VI	Certain documents cited
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application
☒	Box No. VIII	Certain observations on the international application

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44*bis*.3(c) and 93*bis*.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44*bis* .2).

	Date of issuance of this report 11 January 2011 (11.01.2011)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Philippe Becamel e-mail: pt12.pct@wipo.int

Form PCT/IB/373 (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: KEVIN W. MCCABE
STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX
P.L.L.C.
1100 NEW YORK AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 20005-3934

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	23 JUL 2010
Applicant's or agent's file reference 2293.049PC03	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US 09/03994	08 July 2009 (08.07.2009)	08 July 2008 (08.07.2008)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - C07K 16/28; C12P 21/08 (2010.01)
USPC - 530/388.22, 530/387.9

Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US	Date of completion of this opinion	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	19 July 2010 (19.07.2010)	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/03994

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☒ on paper

   ☐ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/03994

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 6-19, 25-29, 44-48, 52-76, 85-89

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☒ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. 6-19,25-29,44-48, 52-76, 85-89 are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 6-19, 25-29, 44-48, 52-76, 85-89

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13*ter*.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/03994

Box No. V **Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4, 23, 30-43, 77-81	YES
	Claims	1-3, 5, 20-22, 24, 49-51, 82-84	NO
Inventive step (IS)	Claims	4, 23, 30-43, 77-81	YES
	Claims	1-3, 5, 20-22, 24, 49-51, 82-84	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84	YES
	Claims	none	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-3, 5, 20-22, 24, and 49-51 lack novelty as defined by PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2008/0131434 A1 to Lewicki et al. (hereinafter Lewicki).

Regarding claim 1 Lewicki teaches an isolated antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch2 (para [0229], [0124], claim 3), wherein the antibody specifically binds to EGF repeat 10 of human Notch2 (para [0097], [0105]).

Regarding claim 2, claim 1 is anticipated as above. Further, Lewicki teaches wherein the antibody of claim 1 is an antagonist of human Notch2 (para [0124]).

Regarding claim 3, claim 2 is anticipated as above. Further, Lewicki teaches wherein the antibody of claim 2 inhibits binding of a ligand to human Notch2 (para [0020], [0021], [0032]).

Regarding claim 5, claim 1 is anticipated as above. Further, Lewicki teaches wherein the antibody inhibits signaling of human Notch2 (para [0094]).

Regarding claim 20, Lewicki teaches an isolated antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch3 (para [0124]), wherein the antibody specifically binds to EGF repeat 9 of human Notch3 (para [0097]).

Regarding claim 21, claim 20 is anticipated as above. Further, Lewicki teaches wherein the antibody of claim 20 is an antagonist of human Notch3 (para [0124]).

Regarding claim 22, claim 21 is anticipated as above. Further, Lewicki teaches wherein the antibody of claim 21 inhibits binding of a ligand to human Notch3 (para [0020], [0021], [0032]).

Regarding claim 24, claim 21 is anticipated as above. Further, Lewicki teaches wherein the antibody of claim 21 inhibits signaling of human Notch3 (para [0094]).

Regarding claim 49, Lewicki teaches an isolated antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of two or more human Notch receptors (para [0094], [0124]), wherein if the two or more human Notch receptors comprise Notch2, Notch 1, or Notch4, the antibody specifically binds to EGF10 of Notch2, Notch3, or Notch4 (para [0097], [0101]), and if the two or more human Notch receptors comprise Notch3, the antibody binds to EGF 9 of Notch3 (para [0097], [0101]).

Regarding claim 50, Lewicki teaches the antibody of claim 49, wherein the antibody is an antagonist of the two or more human Notch receptors (para [0124]).

Regarding claim 51, Lewicki teaches the antibody of claim 49 or 50, wherein the two or more human Notch receptors comprise both Notch1 and Notch4 (para [0094], [0124]).

Claims 82-84 Lack novelty as defined by PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2006/0030694 A1 to Kitajewski et al. (hereinafter Kitajewski).

Regarding claim 82, Kitajewski teaches a method of inhibiting angiogenesis in a subject (para abstract, [0020], comprising administering an effective amount of an antagonist of human Notch 2 and/or Notch3 to the subject (para [0111], [0113]).

Regarding claim 83, Kitajewski further teaches the method of claim 82, which is a method of inhibiting angiogenesis by modulating the function of pericytes and/or vascular smooth muscle cells (para [0002]).

Regarding claim 84, Kitajewski further teaches the method of claim 82 or 83, wherein the angiogenesis is tumor angiogenesis (para [0117]).

---continued on supplemental page---

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/03994

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Several paragraphs of the instant application ([0021], [0023] and [0135]), as well as claim 30, refer to "a 59RI IgG2 antibody comprising the heavy chain and light chain of SEQ ID NOs: 16 and 18 (with or without signal sequence), respectively, or as encoded by the DNA deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, under the conditions of the Budapest Treaty on October 15, 2008, and assigned designation number PTA-9547." However, the term "or" in the description suggests that it is possible that the species deposited with the ATCC and assigned designation number PTA-9547 may not be in any way associated with "a 59R1 IgG2 antibody", and, indeed, may have no other support or description within the specification except its designation by the ATCC. Only the information provided by the ATCC, itself, provides a link between the two. It is therefore recommended that Claim 30 be amended as follows: An antibody (59R1) encoded by the polynucleotide deposited with the ATCC and designated by the ATCC as PTA-9547.

Claims 31 and 35 are both directed to antibodies that comprise CDR sequences having up to 4 conservative substitutions. While these claims were allowed on the basis that there is no prior art demonstrating that a sequence having less than 5 substitutions to the longest sequence is known to bind any Notch target, it should be further noted that even a single substitution in the target binding regions of an antibody can alter the target specificity and binding. It is further noted that all of the claimed substitutions have not been enabled by the specification.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/03994

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**
Continuation of:
Box V(2): Citations and Explanations

Claims 4, 23, 30-43, and 77-81 meet the criteria set forth under PCT Article 33(2)-(3) becasue the prior art does not teach nor fairly suggest the claims as described below.

Regarding claim 4, claim 3 is anticipated as above. Lewicki does not specifically teach the antibody of claim 3 wherein the ligand is DLL4, JAG 1, and/or JAG2. Lewicki does teach an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch1 wherein the antibody is an antagonist of human Notch1 and inhibits binding of a ligand to human Notch1 wherein the ligand is DLL4 or JAG1 (Fig. 3, para [0041], [00245]-[0247]). Neither Lewicki nor any of the prior art teaches the antibody of claim 3 inhibiting binding of a ligand to Notch2, wherein the ligand is DLL4, JAG 1, and/or JAG2.

Regarding claim 23, claim 22 is anticipated as above. Lewicki does not specifically teach the antibody of claim 22 wherein the ligand is DLL4, JAG 1, and/or JAG2. Lewicki does teach an antibody that specifically binds to a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch1 wherein the antibody is an antagonist of human Notch1 and inhibits binding of a ligand to human Notch1 wherein the ligand is DLL4 or JAG1 (Fig. 3, para [0041], [00245]-[0247]). Neither Lewicki nor any of the prior art teaches the antibody of claim 22 inhibiting binding of a ligand to Notch2, wherein the ligand is DLL4, JAG 1, and/or JAG2.

Regarding claim 30, Lewicki teaches an antibody as described above for claims 1 and 20 (para [0229], [0124], para [0097], [0105], claim 3), But Lewicki nor any of the prior art teaches the antibody designated 59R1 nor such encoded by the polynucleotide deposited with the ATCC and designated by the ATCC as PTA-9547.

Regarding claim 31, Lewicki teaches an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3 (para [0229], [0124], claim 3), and various CDR sequences (SEQ ID NOs: 12-14 for example) but does not specifically teach wherein the antibody comprises
(a) a heavy chain CDRI comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions;
(b) a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and
(c) a heavy chain CDR3 comprising either SIFYTT (SEQ ID NO:51) or GIFFAI (SEQ ID NO:7), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions. While the claimed sequences are known to occur in various proteins and polypeptides from a wide variety of sources, nothing in the prior art teaches nor fairly suggests these sequences as components of heavy chain CDR regions 1, 2, and 3 as claimed.

Claim 32 depends from claim 31 and therefore meets the criteria for essentially the same reasons.

Regarding claim 33, Lewicki teaches an antibody that specifically binds human Notch2 and/or Notch3 (para [0229], [0124], claim 3), and and various CDR sequences (SEQ ID NOs: 12-14 for example) but does not specifically teach wherein the antibody comprises a heavy chain CDRI comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and a heavy chain CDR3 comprising (G/S)(I/S)F(FIY)(A/P)(I/f/SIN) (SEQ ID NO:30). While the claimed sequences are known to occur in various proteins and polypeptides from a wide variety of sources, nothing in the prior art teaches nor fairly suggests these sequences as components of heavy chain CDR regions 1, 2, and 3 as claimed.

Claims 34-36 depend, ultimately, from claim 33 and therefore meets the criteria for essentially the same reasons.

Regarding claim 37, Lewicki teaches an antibody that specifically binds a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch2 and/or Notch3 (para [0229], [0124], claim 3), and and various CDR sequences (SEQ ID NOs: 12-14 for example) but does not specifically teach wherein the antibody comprises:
(a) a heavy chain CDRI comprising SSSGMS (SEQ ID NO:5), a heavy chain CDR2 comprising VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), and a heavy chain CDR3 comprising SIFYTI (SEQ ID NO:51) or GIFFAI (SEQ ID NO:7); and/or
(b) a light chain CDR1 comprising RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), a light chain CDR2 comprising GASSRAT (SEQ ID NO:9), and a light chain CDR3 comprising QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). US 20080076670 A1 to Sivan et al teaches a light chain CDR1 comprising SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 27 at 100% homology) and US 20020086014 A1 to Korman et al. teaches a light chain CDR2 comprising SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 30 at 100% homology). However, none of the prior art teaches nor fairly suggests the combination of sequences as claimed.

Claims 38 and 39 depend, ultimately, from claim 37 and therefore meet the criteria for essentially the same reasons.

---continued on next supplemental page---

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/03994

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:
previous supplemental page:

Regarding claim 40, Lewicki teaches an antibody that specifically binds a non-ligand binding region of an extracellular domain of human Notch2 and/or Notch3 (para [0229], [0124], claim 3), and and various CDR sequences (SEQ ID NOs: 12-14 for example) but neither Lewicki nor any other prior art specifically teaches wherein the antibody comprises:
(a) a heavy chain variable region having at least about 90% sequence identity to SEQ ID NO:50, SEQ ID NO: 14, or SEQ ID NO:20; and/or
(b) a heavy chain variable region having at least about 90% sequence identity to SEQ ID NO: 13 or SEQ IDNO:19.

Claims 41-43 depend, ultimately, from claim 40 and therefore meets the criteria for essentially the same reasons.

Regarding claim 77, Neither Lewicki nor any of the prior art specifically teaches a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 49.

Claim 78 depends from claim 77 and therfore meets the criteria for essentially the same reasons.

Regarding claim 79, Neither Lewicki nor any of the prior art specifically teaches polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15, and SEQ ID NO: 17.

Claims 80 and 81 depend, ultimately, from claim 79 and therfore meets the criteria for essentially the same reasons.

Claims 1-5, 20-24, 30-43, 49-51, and 77-83 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) becasue the subject matter can be made or used in industry.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
14 January 2010 (14.01.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/005566 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/003994

(22) International Filing Date:
8 July 2009 (08.07.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/079,095	8 July 2008 (08.07.2008)	US
61/112,701	7 November 2008 (07.11.2008)	US
61/112,699	7 November 2008 (07.11.2008)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GURNEY, Austin, L.** [US/US]; 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114 (US). **HOEY, Timothy, Charles** [US/US]; 200 Darrell Road, Hillsborough, CA 94010 (US). **HTUN VAN DER HORST, Edward, Thein** [DE/US]; 1788 Oak Creek Drive #314, Palo Alto, CA 94304 (US). **SATO, Aaron, Ken** [US/US]; 1636 Albemarle Way, Burlingame, CA 94010 (US). **LIU, Yuan, Ching** [US/US]; 1108 Sunrise Drive, Fremont, CA 94539 (US). **BRUHNS, Maureen, Fitch** [US/US]; 632 42nd Avenue, San Mateo, CA 94403 (US). **LEWICKI, John, A.** [US/US]; 308 Escobar Avenue, Los Gatos, CA 95032 (US).

(74) Agents: **MCCABE, Kevin, W.** et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, N.W., Washington, DC 20005-3934 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

(88) Date of publication of the international search report:
16 September 2010

(54) Title: NOTCH-BINDING AGENTS AND ANTAGONISTS AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to Notch-binding agents and Notch antagonists and methods of using the agents and/or antagonists for treating diseases such as cancer. The present invention provides antibodies that specifically bind to a non-hgand binding region of the extracellular domain of one or more human Notch receptor, such as Notch2 and/or Notch3, and inhibit tumor growth. The present invention further provides methods of treating cancer, the methods comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to a non-hgand binding region of the extracellular domain of a human Notch receptor protein and inhibits tumor growth.

WO 2010/005566 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/03994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 16/28; C12P 21/08 (2010.01)
USPC - 530/388.22, 530/387.9
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC: 530/388.22, 387.9

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Electronic Databases: PubWEST DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=NO; OP=ADJ; Google Patent, Google Scholar
Search Terms Used: antagonist, Notch2, Notch3, angiogenesis, EGF repeat 10, EGF repeat 9, PTA-9547, 59R1, extracellular domain, antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---- A	US 20080131434 A1 (Lewicki et al.) 05 June 2008 (05.06.2008) esp: abstract, paras [0020], [0021], [0032], [0041], [0094], [0097], [0101], [0105], [0124], [0229], [00245]-[0247], claim 3.	1-3, 5, 20-22, 24, 49-51 ---------- 4, 23, 30-43, 77-81
X	US 20060030694 A1 (Kitajewski et al.) 09 February 2006 (09.02.2006) esp: paras [0002], [0020], [0111], [0113], [0117].	82-84
A	US 20080076670 A1 (Sivan et al.) 27 March 2008 (27.03.2008) esp: SEQ ID NO: 27.	37-39
A	US 20020086014 A1 (Korman et al.) 04 July 2002 (04.07.2002) esp: SEQ ID NO: 30.	37-39
X,P	US 20080187532 A1 (Gurney et al.) 07 August 2008 (07.08.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
X,P	US 20080226621 A1 (Fung et al.) 18 September 2008 (18.09.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	US 20080131908 A1 (Li et al.) 05 June 2008 (05.06.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	US 20080118520 A1 (Li et al) 22 May 2008 (22.05.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	EP0662827 B2 (ARTAVANIS-TSAKONAS et al.) 19 July 1995 (19.07.1995) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	WO2008057144 A2 (Blacklow et al.) 15 May 2008 (15.05.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	US 6090922 A (ARTAVANIS-TSAKONAS et al.) 18 July 2000 (18.07.2000) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 July 2010 (20.07.2010)	23 JUL 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/03994

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☒ on paper

   ☐ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/03994

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-19, 25-29, 44-48, 52-76, 85-89
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/03994

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Pei et al. Competition between Delta and the Abruptex domain of Notch. BMC Developmental Biology 21 Jan 2008, 8:4 (available online at <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/8/4>) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	Luo et al. Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Vol. 17, No. 10, Oct. 1997, p. 6057?6067. entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-014579- -00000-0000

Fecha: 2011-02-08 16:44:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 219

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐