

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-177186- -00000-0000

Fecha: 2011-12-22 17:17:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS ANTI NOTCH-1

SOLICITANTE: PFIZER INC. y RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION

DIRECCION: 235 East 42nd Street, New York,
New York 10017. Y 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 22 Diciembre 2011

P2011/000217



No. 11-177186- -00000-0000

Fecha: 2011-12-22 17:17:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2011/000217

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER INC. y

RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION

Dirección: 235 East 42nd Street, New York,
New York 10017. Y 230 East Grand Avenue,
South San Francisco, CA 94080.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2010/052711

Fecha

Junio 16, 2010

Publicación Internacional No. WO 2010/146550

Fecha

Diciembre 23, 2010

6

Título (54) ANTICUERPOS ANTI NOTCH-1

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28; C07K 16/32.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Junio 18, 2009

(31) Número de Solicitud

61/218.193

9

Comprobante de pago No. 11-

Fecha Diciembre de 2011



ANEXOS



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 expediente No. 09-081.255 y 08-048296



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



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.



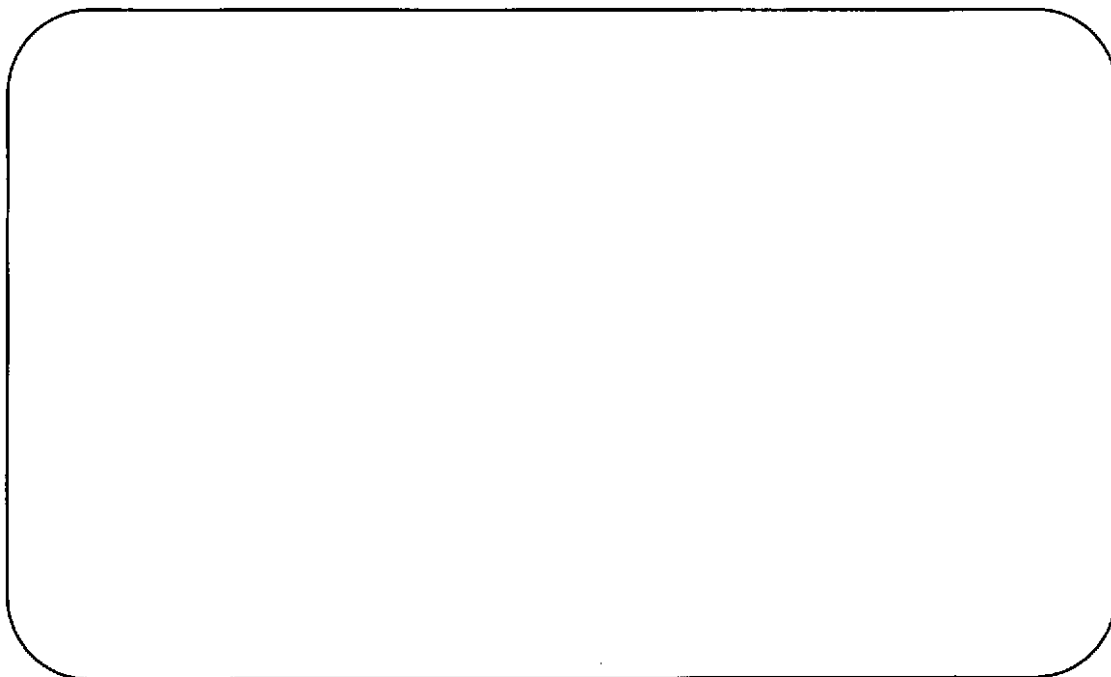
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2010/052711

Zdenek HOSTOMSKY

Pfizer Global Research and Development,
10777 Science Center Drive, San Diego,
California, 92121,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Kang LI

11376 Saddle Cove Lane,
San Diego, California, 92130,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

John Andrew LIPPINCOTT

12427 Via Cabezon, San Diego,
California, 92129
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Qinghai PENG

Pfizer Global Research and Development,
10777 Science Center Drive, San Diego,
California, 92121
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Donna Marie STONE

Rinat Neuroscience Corporation,
230 East Grand Avenue, South San Francisco,
California, 94080
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

4.

Ping WEI

Pfizer Global Research and Development,
10777 Science Center Drive, San Diego,
California, 92121

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Estadounidense

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



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 124768

Bogotá D.C., Diciembre 22 de 2011 - 16:10:13

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	408396144	22/12/2011	6.281.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				<u>\$571.000.00</u>

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

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-177186- -00000-0000

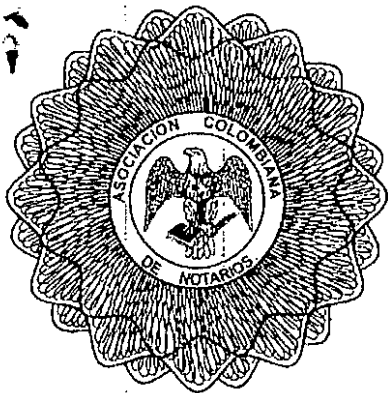
Fecha: 2011-12-22 17:17:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 22 de 2011 - 16:10:14

WK 4682687



ESCRITURA PUBLICA NUMERO ---
TRESIENTOS VEINTIUNO (321).---

En la ciudad de Bogotá, Distrito
Capital, República de Colombia, a los
Veintitres - - - (23) días del mes de
Marzo - - - - - del año dos mil siete
(2007), ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE

Se Dio
3 Copias
29 MAR 2007

URUETA - - - - - NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL
CIRCULO DE BOGOTA, - - -se otorgó la escritura pública que se
consigna en los siguientes términos: -----

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION: -----
CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA - - -
C.C. No. 79.782.747.-----

Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA mayor de
edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, obrando en su propio nombre y
dijo:-----

PRIMERO.- Que presenta para su protocolización y custodia en
los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta
escritura corresponda, en seis (6) folios autenticados, el poder y
sus traducciones el cual del siguiente tenor: -----

PODER GENERAL.-----

El suscrito, PFIZER INC, domiciliado en 235 East 42nd Street,
New York, New York 10017, USA, nombramos por el presente
otorga a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World
Trade Center- Torre A, Calle 100 No. 8ª-37, piso 10, Bogotá D.C.
nuestros representantes legales con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales
en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para

NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urueta

representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado a intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvencciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la Ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento, y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.-----

Firma (illegible) Gregg C. Benson, Assistant General Counsel -----

Fecha: 20 February 2007.-----

Ciudad, Groton, Connecticut 06340 USA.-----

CERTIFICACION NOTARIAL -----

En esta fecha, -----

el Notario Público suscrito certifica: -----

Que GREGG C. BENSON mayor y domiciliado PFIZER INC.,
EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA

7

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

580.136
Held by
C.A. International
DOCUMENTS DEPARTMENT
NORTH
LONDON

- MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

ADP
RESPONSABILIDAD DEL TAXI
HOGE ASUME
2007 MAR 15 A 3:47
DIRECCION DE REGISTRO Y
DIRECCION DE TRAFICO

- NOTARIA VENTISSETE**
María Eugenia Rojas de Urzúa

Si este documento va a ser usado en un país no miembro de la Convención de La Haya de Octubre 5, 1961, debe ser presentado ante la sección consular de la misión representante de ese país. Una apostilla o certificado de legalización solamente confirma que la firma, sello o estampilla en el documento es auténtica. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Oficina de Extranjería de la Comunidad apruebe el contenido.

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA

Fidel Murrin



BOGOTA DC. MARZO 12, 2007

TRADUCCIÓN OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER
(VERIFIQUE ANTES DE PROCEDER)

NOTA DE TRADUCCIÓN: SE TRATA DE UN PODER CONFERIDO POR **PFIZER INC**
A **OLARTE RAISBECK & FRIERI LTD**, DE FECHA **FEB-20-2007**, SUSCRITO EN
GROTON, CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, CON
CERTIFICACIÓN NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y CASTELLANO; Y
CERTIFICACIÓN NOTARIAL Y APOSTILLE IN IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN
ES LA SIGUIENTE:

SE INFORMA QUE YO, **STEPHEN DAVID FINN** DE **31 AMERSHAM HILL DRIVE**
HIGH WYCOMBE BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO, NOTARIO DEBIDAMENTE
AUTORIZADO,

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE TITULADO,

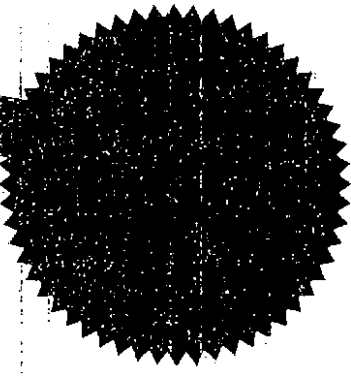
PODER, firmado por **Gregg C Benson**

En este día ha sido presentado a mi por **Servicios Consulares Blair** en nombre
de su cliente **Pfizer**, y que dichos **Servicios Consulares Blair** han manifestado
ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado
ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.

FIRMADO, y sellado en **31 Amersham Hill Drive** antes mencionado, el **23 de**
Febrero 2007.

(HAY FIRMA)
STEPHEN FINN





BE IT KNOWN that I, STEPHEN DAVID FINN of 31 Amersham Hill Drive
High Wycombe Buckinghamshire United Kingdom a duly authorised Notary
Public

CERTIFY only that the document annexed hereto, namely:

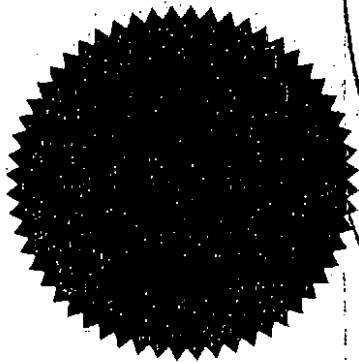
GENERAL POWER signed by Gregg C. Benson.

has this day been presented to me by Blair Consular Services on behalf of
their client Pfizer, and that the said Blair Consular Services have represented
to me by such presentation that their said client has represented to them that
the annexed document is an authentic original document.

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 23rd February
2007.



Stephen Finn
Notary Public



NOTARIA VENTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Ilustre

OLIO

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by Stephen David Finn
a été signé par

3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté
6. the/le 27 February 2007

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No H303068

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: O Williams



Handwritten signature of O Williams.

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

General Power

The undersigned,

domiciled in

hereby appoint Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. with offices in the World Trade Center - Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

Signature/Firma:

Date/Fecha:

City/Country:

Gregory C. Benson, Assistant General Counsel

20 February 2007

Groton, Connecticut 06340 USA

El suscrito,

PFIZER INC.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, New York 10017 USA

nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center - Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvencciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión; percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Montre
Natalia Castro
Zayde Chabín
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Sabinas
Alexander Agudelo
Camilo A. Rodríguez
Of Counsel
Guillermo Chabín
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

NOTARIA VENTISIELE
María Eugenia Rojas de Urzeta

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date,
20 February 2007

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

PFIZER INC., EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340, USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as ASSISTANT GENERAL COUNSEL
OF PFIZER INC.

3. That Pfizer Inc.
having its principal place of business located in
235 East 42nd Street, New York, NY 10017
USA

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the General Power is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
General Power and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

GREGG C. BENSON

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

Nancy M. George

NANCY M. GEORGE

Notary Public

My Commission Expires 30 June 2011

WK 4682689



suscribió el documento que antecede. ---

2- Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de ---

4. Que con sede principal ubicada en ---
está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el

poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4.- Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.-----

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3, y 4 fue la exhibición de (los) (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s): NANCY M. GEORGE Notary Public My commission Expires 30 June 2001.-----

BOGOTA, MARZO 12, 2007.-----

TRADUCCION OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER-----

NOTA DE TRADUCCION: SE TRATA DE UN PODER CONFERIDO POR PFIZER INC A OLARTE RAISBECK & FRIER LTD DE FECHA FEB-20-2007, SUSCRITO EN GROTON CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, CON CERTIFICACION NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y CASTELLANO; Y CERTIFICACION NOTARIAL Y APOSTILLE IN IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE:-----

SE INFORMA QUE YO, STEPHEN DAVID FINN DE 31 AMERSHAM HILL DRIVE HIGH WYCOMBE BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO NOTARIO DEBIDAMENTE AUTORIZADO-----

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE TITUADO,-----

PODER, firmado por Gregg C Benson-----

En este día ha sido presentado a mi por Servicios Consulares Blair en nombre de su cliente Pfizer, y que dichos Servicios Consulares

NOTARIA VENTISIEVE
Maria Eugenia Rojas de Uribe

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO



Blair han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.-----

FIRMADO, y sellado en 31 Amersham Hill Drive antes mencionado, el 23 de Febrero 2007.-----

(HAY FIRMA) STEPHEN FINN NOTARIO PUBLICO (HAY SELLO ADHERIDO).-----

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte -----

ESTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: STEPHEN DAVID FINN-----

3. ACTUANDO EN CALIDAD DE NOTARIO PUBLIC-----

4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO -----

CERTIFICADO

5. EN LONDRES-----

6) EL DÍA FEBRERO 27, 2007 -----

7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y LA COMUNIDAD.-

8. NR.H303068 -----

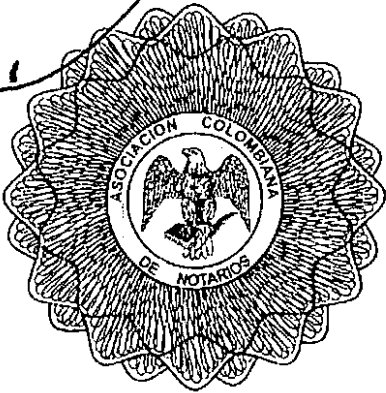
9. SELLO/ ESTAMPILLA: == -----

10. Firmado O. WILLIAM (HAY FIRMA)-----

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, anexo.-----

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA Traductor e Interprete Oficial Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia (fdo. Fidel Murcia)".-----

WK 4682690



SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado cuidadosamente sus nombres completos, estado(s) civil(es), los número(s) de sus documentos de identidad; Declara(n) que todas las informaciones consignadas en el presente instrumento son correctas y, en consecuencia, asumen la responsabilidad que se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conocen la ley y saben que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.

NOTARIA VENTISIETE
Marta Eugenia Rojas de Guerra

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el(los) compareciente(s) y advertido(s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí-la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. -----

Se utilizaron las copias de papel Notarial Nos: WK 4682687, WK 4682689, WK 4682690.-----

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

DERECHOS LEGALES: \$ 38.110.00

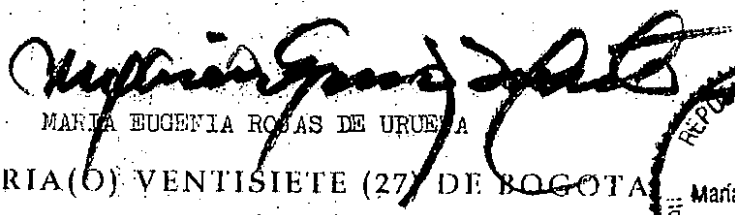
RESOLUCION 7880 DE 2006

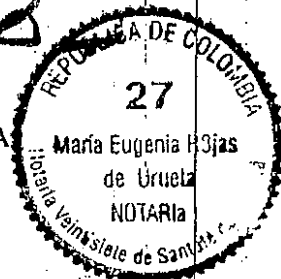
IVA \$ 12.078.00


CARLOS REINALDO OJARTE GARCIA

C.C.No. 79'782.747 BA

TEL: 601-7700


MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTA



redb.

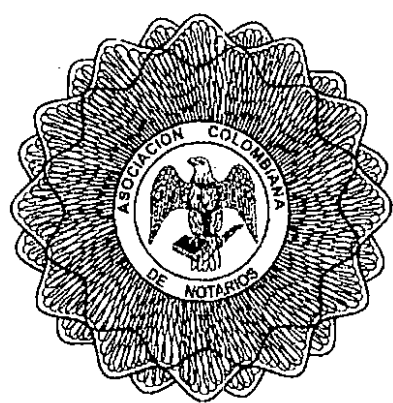
Es fiel y Sexta (6^a)
fotocopia de la Escritura Pública No. 321
de fecha 23 de Marzo de 2007
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 22 MAYO 2007
El Notario Vintisiete de Santafé de Bogotá.



WK 4683984



ESCRITURA PUBLICA NUMERO = = = = =
QUINIENTOS VEINTINUEVE (529) = = = = =

En la ciudad de Bogotá, Distrito
Capital, República de Colombia, a los
Diez = = = = = (10) días del mes de
Mayo = = = = = de dos mil siete (2007),
ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA =

= = = = = NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL
CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura pública que se
consigna en los siguientes términos: -----

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION: -----
OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA-----
NIT: 830122870-6-----

Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA mayor de
edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, obrando en nombre y
representación OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA, con
número de identificación tributaria (NIT) 830122870-6 entidad
legalmente constituida mediante escritura pública número mil
ciento diecinueve (1119) de la notaría treinta y nueve (39) de
Bogotá del diez (10) de junio de dos mil tres (2003), como lo
acredita con el certificado de constitución y gerencia expedido por
la Cámara de Comercio de Bogotá que presenta para su
protocolización y declaró -----

PRIMERO.- Que presenta para su protocolización y custodia en
los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta
escritura corresponda, en seis (6) folios autenticados, un poder
con su traducción la cual es del siguiente tenor:-----
" PODER GENERAL.- -----

NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urueta

El suscrito, RINAT NEUROSCIENCES CORPORATION, domiciliado en 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, USA, nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center-Torre A, Calle 100 No. 8A-37, piso 10, Bogotá D.C. nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado a intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y recon convenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la Ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.-----



01



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

26 DE MARZO DE 2007

HORA 09:25:34

02DLM032606304PCT0708

HOJA : 001

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA, CON FUNDAMENTO EN LAS MATRICULAS E INSCRIPCIONES DEL REGISTRO MERCANTIL,

CERTIFICA :

NOMBRE : OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA PERO PARA TODOS LOS EFECTOS PODRA OPERAR BAJO EL NOMBRE OLARTERAISBECK

N.I.T. : 830122870-6 ADMINISTRACION: BOGOTA PERSONAS JURIDICAS, REGIMEN COMUN.

DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA :

MATRICULA NO. 01284164

CERTIFICA :

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001119 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE JUNIO DE 2003, INSCRITA EL 25 DE JUNIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00885810 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD COMERCIAL DENOMINADA: OR LEGAL LTDA

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001328 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 4 DE JULIO DE 2003, INSCRITA EL 9 DE JULIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00887749 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : OR LEGAL LTDA POR EL DE : OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA PERO PARA TODOS LOS EFECTOS PODRA OPERAR BAJO EL NOMBRE OLARTERAISBECK

CERTIFICA :

REFORMAS:

ESCRITURA	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	INSCRIPCION	FECHA
0001328	2003/07/04	00039	BOGOTA D.C.	00887749	2003/07/09

CERTIFICA :

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE JUNIO DE 2103 .

CERTIFICA :

OBJETO SOCIAL : LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO PRINCIPAL LA PRESTACION DE SERVICIOS DE ASESORIA EN EL AREA SOCIAL, TECNICA, COMERCIAL Y JURIDICA, DE PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, NACIONALES O EXTRANJERAS, PUBLICAS O PRIVADAS. EN DESARROLLO DE SU OBJETO SOCIAL PODRA : A. PRESTAR ASESORIA Y EJERCER LA REPRESENTACION JUDICIAL DE PERSONAS NATURALES O JURIDICAS ANTE LAS DIFERENTES JURISDICCIONES Y PARTICIPAR EN SU NOMBRE Y REPRESENTACION EN TRIBUNALES DE ARBITRAMENTO, AMIGABLE COMPOSICION, CONCILIACION Y MEDIACION. B. CONFORMAR Y PARTICIPAR EN CENTROS DE ARBITRAJE Y CONCILIACION. C. CELEBRAR Y EJECUTAR TODAS LAS OPERACIONES DE CAMBIO Y COMERCIO EXTERIOR QUE REQUIERA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA COMPAÑIA ; D. ADQUIRIR, ENAJENAR, GRAVAR, DAR O TOMAR EN ARRENDAMIENTO TODA CLASE DE BIENES, DANDO O RECIBIENDO LAS GARANTIAS DEL CASO CUANDO HAYA LUGAR A ELLAS ;

NOTARIA VENTISIETE
María Eugenia Rojas de Uribe

E. INTERVENIR COMO DEUDORA O ACREEDORA EN TODA CLASE DE OPERACIONES DE CREDITO, DANDO O RECIBIENDO LAS GARANTIAS DEL CASO CUANDO HAYA LUGAR A ELLAS ; F. CELEBRAR CON ESTABLECIMIENTOS DE CREDITO NACIONALES O EXTRANJEROS Y CON COMPAÑIAS ASEGURADORAS TODAS LAS OPERACIONES QUE SE RELACIONEN CON LOS NEGOCIOS Y BIENES SOCIALES. G. ABRIR, OPERAR Y CERRAR CUALQUIER TIPO DE CUENTAS BANCARIAS ; H. GIRAR, ACEPTAR, ENDOSAR, ASEGURAR, COBRAR, RECHAZAR, PROTESTAR, AVALAR GARANTIZAR Y NEGOCIAR EN GENERAL TODA CLASE DE INSTRUMENTOS NEGOCIABLES Y CUALQUIER OTRA CLASE DE TITULOS DE CREDITO ; I. ORGANIZAR, PROMOVER, FORMAR Y FINANCIAR SOCIEDADES O EMPRESAS NACIONALES O EXTRANJERAS QUE TIENDAN A FACILITAR, ENSANCHAR, O COMPLEMENTAR LOS NEGOCIOS SOCIALES DENTRO Y FUERA DEL PAIS Y SUSCRIBIR ACCIONES O CUOTAS EN ELLAS, Y EJERCER TODOS LOS DERECHOS Y OBLIGACIONES ECONOMICOS Y CORPORATIVOS QUE SURJAN DE DICHA PARTICIPACION. J. CREAR CONSORCIOS Y UNIONES TEMPORALES. K. SERVIR DE COMISIONISTA O INTERMEDIARIO COMERCIAL A TITULO DE CORRETAJE O A CUALQUIER OTRO TITULO ; L. SER CORRESPONSAL Y TENER CORRESPONSALES INTERNACIONALES ; M. EFECTUAR AVALUOS COMERCIALES DE TODA CLASE DE BIENES. N. ADQUIRIR Y CONSTRUIR TODA CLASE DE INSTALACIONES INDUSTRIALES O COMERCIALES COMO FABRICAS, TALLERES, ALMACENES DE DISTRIBUCION O VENTA ESTABLECIMIENTOS DE COMERCIO, ETC. O. DISTRIBUIR O VENDER TODO TIPO DE PRODUCTOS Y ABRIR Y ADMINISTRAR, DIRECTA O INDIRECTAMENTE, LOS ESTABLECIMIENTOS DE COMERCIO QUE SEAN NECESARIOS PARA ELLO. P. ENAJENAR, ARRENDAR, GRAVAR Y ADMINISTRAR EN GENERAL LOS BIENES QUE COMPONEN EL PATRIMONIO SOCIAL. Q. APORTAR SUS BIENES, EN TODO O EN PARTE, A OTRA U OTRAS SOCIEDADES A QUE LE CONVENGA VINCULARSE PARA UN MEJOR DESARROLLO DE SUS NEGOCIOS. R. TRANSIGIR, DESISTIR O SOMETER A DECISIONES ARBITRALES LAS CUESTIONES EN QUE TENGA INTERES FRENTE A TERCEROS. ; S. SOLICITAR, CONSEGUIR LOS REGISTROS RESPECTIVOS ANTE LA AUTORIDAD COMPETENTE Y EXPLOTAR EL DERECHO SOBRE MARCAS, NOMBRES COMERCIALES O CUALQUIER SIGNO DISTINTIVO, DIBUJOS, INSIGNIAS, PATENTES Y CUALQUIER OTRO DERECHO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL O INTELECTUAL YA SEA A NOMBRE DE LA SOCIEDAD O DE UN TERCERO. T. HACER PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES RELACIONADAS CON EL OBJETO SOCIAL. U. CELEBRAR Y EJECUTAR CON SU PROPIO NOMBRE Y POR CUENTA DE TERCEROS O EN PARTICIPACION CON ELLOS, ACTOS O CONTRATOS Y OPERACIONES EN GENERAL, TODO ACTO O CONTRATO QUE SEA NECESARIO O CONVENIENTE PARA CUMPLIR O FACILITAR LOS ACTOS Y OPERACIONES PREVISTAS EN LOS ESTATUTOS Y QUE DE MANERA DIRECTA SE RELACIONEN CON EL OBJETO SOCIAL, TAL COMO QUEDA DETERMINADO.

CERTIFICA :

CAPITAL Y SOCIOS : \$ 120,000,000.00 DIVIDIDO EN 12,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$ 10,000.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIOS CAPITALISTA(S)

FRIERI DEL CASTILLO ANA MARIA	C.C. 00045483209
NO. CUOTAS: 4,000.00	VALOR:\$40,000,000.00
RAISBECK LLINAS JAMES IAN	C.C. 00079376996
NO. CUOTAS: 4,000.00	VALOR:\$40,000,000.00
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO	C.C. 00079782747
NO. CUOTAS: 4,000.00	VALOR:\$40,000,000.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 12,000.00	VALOR :\$120,000,000.00
-----------------------	-------------------------

CERTIFICA :

REPRESENTACION LEGAL : LA SOCIEDAD TENDRA UN GERENTE GENERAL, EL CUAL TENDRA UN PRIMER SUPLENTE Y UN SEGUNDO SUPLENTE QUE LO



01

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

26 DE MARZO DE 2007

HORA 09:25:34

02DLM032606304PCT0708

HOJA : 002

REEMPLAZARA EN SUS FALTAS ABSOLUTAS, TEMPORALES O ACCIDENTALES, Y CUYA DESIGNACION Y REMOCION CORRESPONDERA TAMBIEN A LA JUNTA DE SOCIOS.

CERTIFICA :

** NOMBRAMIENTOS : **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001119 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE JUNIO DE 2003, INSCRITA EL 25 DE JUNIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00885810 DEL LIBRO IX, FUE(ON) NOMBRADO(S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
GERENTE	
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO	C.C.00079782747
PRIMER SUPLENTE DEL GERENTE	
RAISBECK LLINAS JAMES IAN	C.C.00079376996
SEGUNDO SUPLENTE DEL GERENTE	
FRIERI DEL CASTILLO ANA MARIA	C.C.00045483209

CERTIFICA :

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL : EL GERENTE GENERAL ES EL REPRESENTANTE LEGAL DE LA SOCIEDAD, Y EN CASO DE FALTA TEMPORAL O ABSOLUTA HARA SUS VECES EL PRIMER SUPLENTE O EN SU DEFECTO EL SEGUNDO SUPLENTE, TAMBIEN ELEGIDOS POR LA JUNTA DE SOCIOS. EL GERENTE REPRESENTARA Y COMPROMETERA A LA SOCIEDAD FRENTE A TERCEROS, SEAN PERSONAS O ENTIDADES PARTICULARES, OFICIALES O JUDICIALES. ASI MISMO, PODRA CELEBRAR EN SU NOMBRE CONTRATO DE ARRENDAMIENTO COMO ARRENDADOR O ARRENDATARIO. CONSTITUIR APODERADOS DE LA SOCIEDAD, DESISTIR, INTERPONER TODA CLASE DE RECURSOS RECIBIR DINERO EN MUTUO, HACER DEPOSITOS BANCARIOS O DE CUALQUIER OTRA INDOLE, FIRMAR TITULOS VALORES Y NEGOCIARLOS, TENERLOS, CONTRATARLOS, PAGARLOS, ENDOSARLOS, DESCARGARLOS, CELEBRAR CONTRATOS COMERCIALES, EJECUTAR LOS ACUERDOS DE LA JUNTA DE SOCIOS Y CONVOCARLA A REUNIONES ORDINARIAS O EXTRAORDINARIAS, SUSCRIBIR CONTRATOS LABORALES A NOMBRE DE LA SOCIEDAD, Y EN GENERAL TODAS LAS GESTIONES QUE OBEDEZCAN A LA NATURALEZA DE SU ENCARGO Y QUE SE RELACIONEN DIRECTAMENTE CON EL GIRO ORDINARIO DE LOS NEGOCIOS SOCIALES. EL GERENTE REQUERIRA APROBACION DE LA JUNTA DE SOCIOS PARA CELEBRAR ACTOS CUYA CUANTIA SEA O EXCEDA LA SUMA DE DIEZ MILLONES DE PESOS (\$10,000,000) MONEDA CORRIENTE.

CERTIFICA :

** REVISOR FISCAL: **

QUE POR ACTA NO. 0000006 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 5 DE MARZO DE 2004, INSCRITA EL 8 DE JULIO DE 2004 BAJO EL NUMERO 00942232 DEL LIBRO IX, FUE(ON) NOMBRADO(S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
LACHE NUÑEZ JOSE LUCIO	C.C.00006763005

CERTIFICA :

DIRECCION DE NOTIFICACION JUDICIAL : CLL 100 NO 8A-37 P 10 W.T.C.

NOTA: En las hojas de Bruto

T A

MUNICIPIO : BOGOTA D.C.

DIRECCION COMERCIAL : CLL 100 NO 8A-37 P 10 W.T.C. T A

MUNICIPIO : BOGOTA D.C.

E-MAIL : ELIZABETH.BARBOSA@OLARTERAISBECK.COM

CERTIFICA :

QUE LA SOCIEDAD TIENE MATRICULADOS LOS SIGUIENTES ESTABLECIMIENTOS :

NOMBRE : OR LEGAL I.LIMITADA

MATRICULA NO. 01284255

RENOVACION DE LA MATRICULA : EL 27 DE MARZO DE 2006

ULTIMO AÑO RENOVADO : 2006

CERTIFICA :

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

INFORMACION COMPLEMENTARIA

LOS SIGUIENTES DATOS SOBRE RIT Y PLANEACION DISTRITAL SON INFORMATIVOS

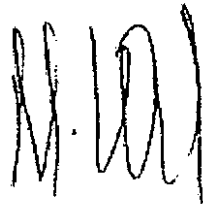
CONTRIBUYENTE INSCRITO EN EL REGISTRO RIT DE LA DIRECCION DISTRITAL DE IMPUESTOS, FECHA DE INSCRIPCION 2003/06/24

FECHA DE ENVIO DE INFORMACION A PLANEACION DISTRITAL: 10 DE JULIO DE 2004

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

VALOR : \$ 3,000.00

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES.



15

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO CUYO ORIGINAL ESTÁ EN INGLÉS

Nota adjunta:

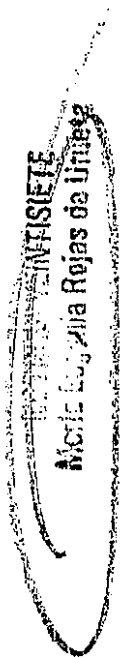
560686 - Estado de New York - Condado de New York

Yo, Norman Goodman, Registrador del Condado y Registrador de la Corte Suprema, Condado de New York, la cual es una Corte de Registro, poseedor por ley de un sello, certifico por medio del presente documento que (...), ante o por quien fue firmado el registro anexo, era en la fecha del mismo un Notario Público de la ciudad en y para el Condado de New York, debidamente comisionado, juramentado y cualificado para actuar como tal. Que de acuerdo con la ley, una comisión o un certificado de su carácter oficial, con su firma autógrafa ha sido archivado en mi oficina; que al momento de tomar dicha prueba, reconocimiento o juramento, ella estaba debidamente autorizada para tomar la (lo); que estoy bien familiarizado con la firma de dicho funcionario o he comparado su firma con la depositada en mi oficina por lo cual creo que la firma en el registro adjunto es genuina.

Como constancia de lo anterior, he puesto aquí mi firma y el sello oficial este 19 de Abril de 2007.

(Firmado): Norman Goodman - Registrador del Condado y Registrador de la Corte Suprema, Condado de New York.

Sello redondo sobre esta nota: "Condado de New York"




Norman Goodman
Notario Público de la Corte Suprema
Licencia 378 - 1993 Alameda

Apostilla adjunta:

Estado de Florida Departamento de Estado APOSTILLA: (Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Norman Goodman
3. Actuando en calidad de:	Registrador del Condado
4. Lleva el sello/estampilla de:	Condado de New York
<u>Certificado</u>	
5. En:	New York, New York
6. El:	1º de Mayo de 2007.
7. Por:	Sub Secretario Especial del Estado, de New York.
8. Bajo el No.:	NYC-10256048B
9. Sello seco / estampilla:	==
10. Firma:	James Bizzarri Sub Secretario Especial del Estado

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto:

Título: "Apostilla New Y."

Fecha: 8 de Mayo de 2007.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 218-2308, (57-1) 623-2925.

E-mail: lreseser1@yahoo.com. No. 9859

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376-1993 Minjusticia

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- 1. Country: **United States of America**
This public document
- 2. has been signed by **Norman Goodman**
- 3. acting in the capacity of **County Clerk**
- 4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

- 5. At New York, New York
 - 6. the 01st day of May 2007
 - 7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
 - 8. No. NYC-10256048B
 - 9. Seal/Stamp
 - 10. Signature
- 

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

SECRET
Materia Rojosa destruida

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

General Power

The undersigned,

RINAT NEUROSCIENCES CORPORATION

domiciled in

230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, USA
hereby appoint Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. with offices in the World Trade Center - Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

Poder General

El suscrito,

domiciliado en

230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, USA
nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center - Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconveniones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Signature/Firma:

Grover F. Fuller Jr., Attorney-in-Fact

Date/Fecha:

27 FEBRUARY 2007

City/Country:

New York, New York 10017 USA

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro
Zayde Chahin
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas
Alexander Agudelo
Camilo A. Rodríguez
OF Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Montcalvano

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date, 27th February 2007

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

I. That

1. Que

GROVER F. FULLER JR.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

150 EAST 42ND STREET, NEW YORK, NEW YORK 10017 USA
signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as ATTORNEY-IN-FACT

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION

4. Que

having its principal place of business located in 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, USA

con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

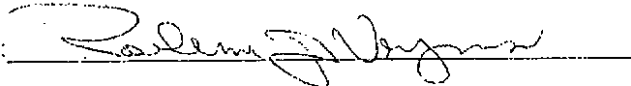
4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s): POWER OF ATTORNEY dated 18 July 2006 (expiring on 18 July 2009)

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):



ROSELAINE J VERGNIAUD
Notary Public State of New York
No. 01VE6011435
Qualified in Queens County
Certificate Filed in New York County
Commission Expires August 10, 2010

ROSALINE VERGNIAUD
Maria Eugenia Rojas de Unzueta



State of New York
County of New York,

560686

Form 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

NC

Arrellaine Hugonians

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

APR 19 2007

FEE PAID \$3.00

Norman Goodman

County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

WK 4683985



Firma (ilegible) Grover F. Fuller JR.,
Attorney-in-fact -----

Fecha: 27 February 2007.-----

City Country: New York, New York
10017 USA.-----

CERTIFICACION NOTARIAL -----

En esta fecha,-----

el Notario Público suscrito certifica:-----

1. Que GROVER F. FULLER JR, mayor de edad y domiciliado 150
EAST 42nd STREET, NEW YORK, NEW YORK 10017 USA suscribió
el documento que antecede. -----

2- Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su
carácter de -----

4. Que ----- con sede principal ubicada en-----
está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y
que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra
dentro de los que comprenden su objeto social. -----

4.- Que el otorgante tiene la representación para suscribir el
poder, y que ésta es legítima.-----

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos
2, 3, y 4 fue la exhibición de (los) (del) siguiente(s) documento(s).
auténtico(s): (fdo. ilegible) ROSELAINÉ J. VERGNIAUD Notary
Public Of New York No. 01VE6011435 Qualified in Queens Country
Certificate Filed in New York Country Comisión Expires August
10.2010.-----

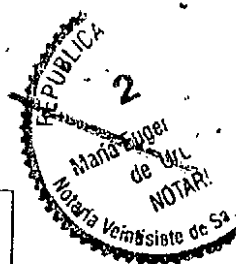
TRADUCCION OFICIAL DE UN DOCUMENTO CUYO ORIGINAL
ESTA EN INGLES.-----

Nota adjunta: -----

560686- Estado de New York.-----

Yo, Normas Goodman, Registrador del condado y Registrador de
la Cortes Suprema, Condado de New York, la cual es una Corte de
Registro, poseedor por ley de un sello, certifico pro medio del

NOTARIA VENTISIEVE
María Eugenia Rojas de Uruea



presente documento que (...), ante o por quien fue firmado el registro anexo, era en la fecha del mismo un notario Público de la ciudad en y para el Condado de New York, debidamente comisionado, juramentado y cualificado para actuar como tal. Que de acuerdo con la ley, una comisión o un certificado de su carácter oficial, con su firma autógrafa ha sido archivado en mi oficina; que al momento de tomar dicha prueba, reconocimiento o juramento, ella estaba debidamente autorizada para tomar la (lo); que estoy familiarizado con la firma de dicho funcionario o he comparado su firma con la depositada en mi oficina por lo cual creo que la firma en el registro adjunto es genuina.-----

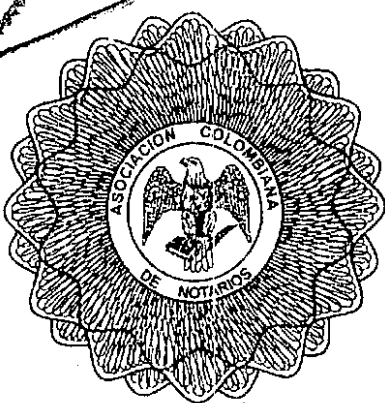
Como constancia de lo anterior, he puesto aquí mi firma y el sello oficial este 19 de Abril de 2007.-----

(Firmado): Norman Goodman- Registrador del Condado y Registrador de la Corte Suprema, Condado de New York. Sello redondo sobre esta nota: "Condado de New York".-----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dicho documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado cuidadosamente sus nombres completos, estado(s) civil(es), los número(s) de sus documentos de identidad; Declara(n) que todas las informaciones consignadas en el presente instrumento son correctas y, en consecuencia, asumen la responsabilidad que se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conocen la ley y saben que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.

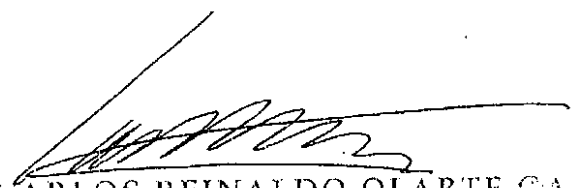
WK 4683986

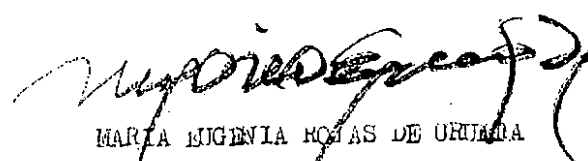


ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mi la(el)

Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. ---Se utilizaron las hojas de papel Notarial Nos WK 4683984, WK 4683985, WK 4683986 = / = = = = =

DERECHOS LEGALES: \$ 38.110.00
RESOLUCION 7880 DE 2006
IVA \$ 13.787.00


CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA
C.C.No. 79782.747 Bogotá
TEL: 601-7700


MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA(O)-VENTISIETE (27) DE BOGOTÁ
redb.



Es fiel y Segunda 2ª
fotocopia de la Escritura Pública No. 529
de fecha 10 de Mayo de 2007
tomada de su original que expido en
Ocho (8) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C. a 11 MAYO 2007
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá



ESPACIO EN BLANCO

VIII-1-1	Declaration: Identity of the Inventor Declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))	In relation to this international application
	Name (LAST, First) Address	HOSTOMSKY, Zdenek of Pfizer Global Research and Development 10777 Science Center Drive San Diego, California 92121 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	LI, Kang of 11376 Saddle Cove Lane San Diego, California 92130 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	LIPPINCOTT, John Andrew of 12427 Via Cabezon San Diego, California 92129 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	PENG, Qinghai of Pfizer Global Research and Development 10777 Science Center Drive San Diego, California 92121 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application

Name (LAST, First) Address	STONE, Donna Marie of Rinat Neuroscience Corporation 230 East Grand Avenue South San Francisco, California 94080 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
Name (LAST, First) Address	WEI, Ping of Pfizer Global Research and Development 10777 Science Center Drive San Diego, California 92121 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application

PC33897A

PCT REQUEST

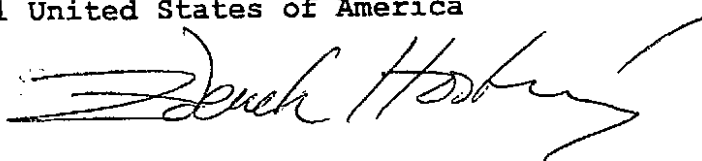
Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-4-1	Declaration: Inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:	I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought. This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application). This declaration is directed to international application No. PCT/IB2010/052711. (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter). I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name. I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications", by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month, and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.
VIII-4-1-1	Prior applications:	

PC33897A

PCT REQUEST

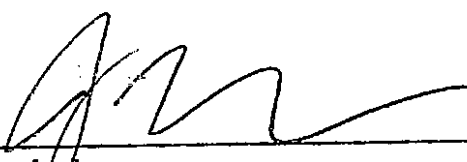
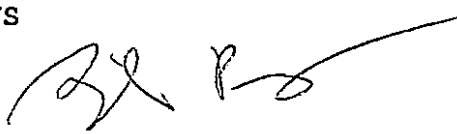
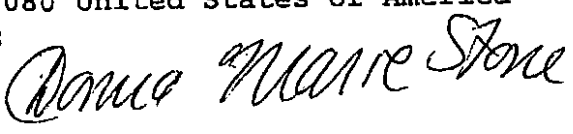
Print Out (Original in Electronic Form)

		I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.
VIII-4-1-1-1	Name (LAST, First)	HOSTOMSKY, Zdenek
VIII-4-1-1-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	San Diego, California
VIII-4-1-1-3	Mailing address:	Pfizer Global Research and Development 10777 Science Center Drive San Diego, CA 92121 United States of America
VIII-4-1-1-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-1-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-1-6	Date:	JUN 24 2010

PC33897A

PCT REQUEST

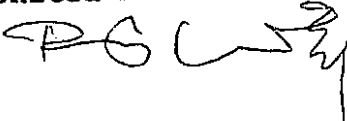
Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-4-1-2-1	Name (LAST, First)	LI, Kang
VIII-4-1-2-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	San Diego, California
VIII-4-1-2-3	Mailing address:	11376 Saddle Cove Lane San Diego, CA 92130 United States of America
VIII-4-1-2-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-2-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-2-6	Date	Oct. 1, 2010
VIII-4-1-3-1	Name (LAST, First)	LIPPINCOTT, John Andrew
VIII-4-1-3-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	San Diego, California
VIII-4-1-3-3	Mailing address:	12427 Via Cabezon San Diego, CA 92129 United States of America
VIII-4-1-3-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-3-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-3-6	Date	7-23-10
VIII-4-1-4-1	Name (LAST, First)	PENG, Qinghai
VIII-4-1-4-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	San Diego, California
VIII-4-1-4-3	Mailing address:	Pfizer Global Research and Development 10777 Science Center Drive San Diego, CA 92121 United States of America
VIII-4-1-4-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-4-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-4-6	Date	JUN 24 2010
VIII-4-1-5-1	Name (LAST, First)	STONE, Donna Marie
VIII-4-1-5-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	South San Francisco, California
VIII-4-1-5-3	Mailing address:	Rinat Neuroscience Corporation 230 East Grand Avenue South San Francisco, CA 94080 United States of America
VIII-4-1-5-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-5-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-5-6	Date	7-7-2010

PC33897A

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-4-1-6-1	Name (LAST, First)	WEI, Ping
VIII-4-1-6-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	San Diego, California
VIII-4-1-6-3	Mailing address:	Pfizer Global Research and Development 10777 Science Center Drive San Diego, CA 92121 United States of America
VIII-4-1-6-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-6-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-6-6	Date	JUN 24 2010

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
23 December 2010 (23.12.2010)



(10) International Publication Number
WO 2010/146550 A1

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2010/052711
- (22) International Filing Date:
16 June 2010 (16.06.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/218,193 18 June 2009 (18.06.2009) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US). **RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION** [US/US]; 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **HOSTOMSKY, Zdenek** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 10777 Science Center Drive, San Diego, CA 92121 (US). **LI, Kang** [US/US]; 11376 Saddle Cove Lane, San Diego, CA 92130 (US). **LIPPINCOTT, John, Andrew** [US/US]; 12427 Via Cabezon, San Diego, CA 92129 (US). **PENG, Qinghai** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 10777 Science Center Drive, San Diego, CA 92121 (US). **STONE, Donna, Marie** [US/US]; Rinat Neuroscience Corporation, 230 East

Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **WEI, Ping** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 10777 Science Center Drive, San Diego, CA 92121 (US).

- (74) Agent: **BENSON, Gregg C.**; Pfizer Inc., Eastern Point Road MS9114, Groton, CT 06340 (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, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, 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).

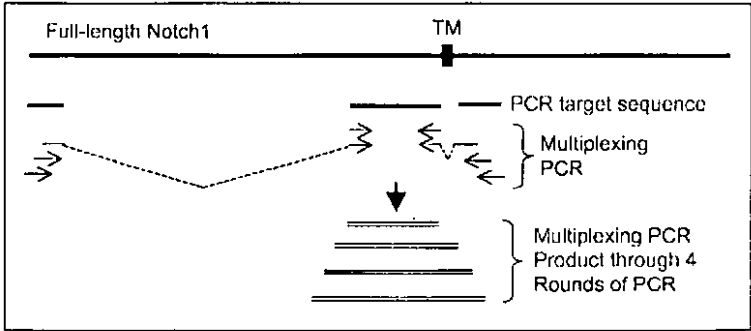
Declarations under Rule 4.17:
— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))

[Continued on next page]

(54) Title: ANTI NOTCH-1 ANTIBODIES

FIG. 1

PCR synthesis of N1-NRR-TM(-) cDNA



(57) Abstract: This invention is directed toward monoclonal antibodies that bind specifically to Notch1. In one embodiment, the antibodies binds to at least a first epitope and a second epitope, wherein the first epitope resides with the LinA domain of the Notch1 negative regulatory region (NRR), and the second epitope resides within the HD-C domain of the Notch1 NRR.

WO 2010/146550 A1



— of inventorship (Rule 4.17(iv))

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 sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

ANTI NOTCH-1 ANTIBODIES

The present application claims the benefit of United States Provisional Patent Application No. 61/218,193, filed June 18, 2009, the disclosure of which is incorporated
5 herein by reference in its entirety.

Field of the Invention

The present invention relates to antibodies that antagonize the activity of Notch-1, method of producing such antibodies, method of assaying such antibodies and method of using such antibodies in the treatment of cancer.

10

Background

Notch proteins are transmembrane receptor proteins. There are four such notch receptors in mammals. During receptor maturation, the ectodomains of mammalian notch receptors are cleaved at a S₁ site by a furin-like protease, yielding an extracellular
15 subunit and a transmembrane subunit that are held together by a heterodimerization (HD) domain. The part of HD domain associated with extracellular subunit is referred to as HD-N, and the other part of HD, extracellular moiety of transmembrane subunit, referred to as HD-C. The extracellular subunit contains a large epidermal growth factor (EGF)-like repeat region and three Lin12 repeats. Ligand binding of the EGF-repeat
20 regions induces a proteolytic cleavage by ADAM-type metalloprotease at the S₂ site within the HD-C domain,, which triggered subsequent cleavage by γ-secretase at site S₃ releases the intracellular part of notch from the membrane, allowing it to move into the nucleus and regulate gene transcription. (Gordon, W.R., et.al, Nature Structural &Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300).

25 Before ligand induced activation, notch is maintained in a resting metalloprotease-resistant confirmation by a conserved negative regulation region (NRR), which consists of the three Lin12 repeats and the HD domain. (Vardar et al., Biochemistry 2003, 41: 7061-7067; Sanchez-Irizarry et al., Mol. Cell. Biol. 2004, 24: 9265-9273; Gordon, W.R., et.al, Nature Structural &Molecular Biology, 2007, volume 14,
30 295-300). NRR of the notch proteins is also sometimes defined as only consisting the Lin12 repeats and the N terminal HD domain (HD-N) after proteolytic cleavage at the S₁ site. (Weng, A.P., et. al, Science, 2004, 9265-9273.) NRR domain prevents the ligand-independent proteolysis of the notch pathway.

The Notch pathways functions during diverse developmental and physiological process including those affecting neurogenesis in flies and vertebrates. In general, notch signaling is involved in lateral inhibition, lineage decisions, and the establishment of boundaries between groups of cells. (Bray, S.J., Nature Reviews, 2006, 678-688).

5 However, notch activities are also associated with a variety of human diseases, including cancer. For example, mutations of notch1 were detected in more than 50% of T-cell acute lymphoblastic leukemia. (Radtko, F, Nature Review, Cancer, 2003, 756-767). There is a need in identifying therapeutic agents that regulate the notch-1 signaling pathway for the use of treating cancer.

10

Summary

In one embodiment, this invention provides an isolated antibody, or an antigen binding portion thereof, that binds to Notch-1, wherein the antibody or antigen binding portion binds to at least a first epitope and a second epitope, wherein the first epitope
15 resides within the Lin-A domain of Notch-1, and the second epitope resides within the HD-C domain of Notch-1. Preferably, the Notch-1 is human Notch-1.

In one aspect of this embodiment, the first epitope is a major epitope. Preferably, a non conservative substitution of any of the amino acid residues of the first epitope results in the loss of more than 60%, more preferably more than 80%, even more
20 preferably more than 90% of the antibody or antigen binding portion's binding affinity to human Notch1.

In another aspect, the second epitope is a major epitope. Preferably, a non conservative substitution of any of the amino acid residues of the second epitope results in the loss of more than 60%, more preferably more than 80%, even more preferably
25 more than 90% of the antibody or antigen binding portion's binding affinity to human Notch-1.

In another aspect, both the first epitope and the second epitope are major epitopes. Preferably, a non conservative substitution of any of the amino acid residues of the first epitope and the second epitope results in the loss of more than 60%, more
30 preferably more than 80%, even more preferably more than 90% of the antibody or antigen binding portion's binding affinity to human Notch-1.

In another aspect of this embodiment, the Notch-1 is human Notch-1. In another aspect of this embodiment, the Notch-1 is mouse Notch-1.

In another aspect of this embodiment, the antibody or the antigen binding portion binds to an additional 1-4 epitopes, wherein each of the said additional epitopes resides within either the Lin-A domain or HD-C domain of human Notch-1.

In another aspect of this embodiment, the only major epitopes that the antibody or antigen binding portion binds to are the first epitope and the second epitope. More specifically, the first epitope is a major epitope comprising 1 to 4 amino acid residues selected from 1463V, 1465S, 1466L and 1467Q of the LinA domain of human Notch-1. Preferably, the first epitope is a major epitope consisting the four amino acid residues selected from 1463V, 1465S, 1466L and 1467Q of the LinA domain of human Notch-1.

Also more specifically, the second epitope is a major epitope comprising of 1 to 5 amino acid residues selected from 1705G, 1706A, 1707L, 1709S and 1710L of the HD-C domain of human Notch-1. Preferably, the second epitope is a major epitope consisting of 1 to 5 amino acid residues selected from 1705G, 1706A, 1707L, 1709S and 1710L of the HD-C domain of human Notch-1. Even more specifically, a non conservative substitution of any of the amino acid residues of the first epitope or the second epitope results in a loss of more than 70%, more than 80%, more than 90% or more than 95% of the antibody or antigen binding portion's binding affinity to human Notch-1.

In another aspect of this embodiment, the antibody or the antigen binding portion is humanized, human, or chimeric. Preferably, the antibody or the antigen binding portion is a humanized antibody or antigen binding portion thereof. More preferably, the antibody or the antigen binding portion is a human antibody or antigen binding portion thereof.

In another aspect of this embodiment, the antibody or the antigen binding portion is a mouse antibody or antigen binding portion thereof.

In another aspect of this embodiment, the antibody or the antigen binding portion binds to human Notch-1 with a K_D of 1×10^{-5} M or less. Preferably, the antibody or the antigen binding portion binds to human Notch-1 with a K_D of 1×10^{-6} M or less, 5×10^{-7} M or less, 2×10^{-7} M or less, 1×10^{-7} M or less, 5×10^{-8} M or less, 2×10^{-8} M or less or 1×10^{-8} M or less.

In another embodiment, this invention provides an isolated antibody, or an antigen binding portion thereof, that specifically binds to human Notch-1, comprising

(i) a heavy chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:18, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:18 are modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified;

5 (ii) a heavy chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:19, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO: 19 are modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified; and

10 (iii) a heavy chain variable region CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:20, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO: 20 are modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified.

In one aspect of this embodiment, of the 12 possible amino acid residue modifications (as described above in this embodiment) of the heavy chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, any of the modifications, except for up to six of the
15 modifications, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof. Preferably, any of the said modifications of the heavy chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, except for up to five of the modifications, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof. More preferably, any of the said
20 modifications of the heavy chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, except for up to four of the modification, except for up to three of the modifications, except for up to two of the modifications or except for one modification, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof. Even more preferably, any of the amino acid residue modification of the heavy chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, is a
25 conservative substitution of the amino acid residue thereof.

In another aspect of this embodiment, none of the heavy chain variable region CDR1, CDR2 and CDR3 is modified.

In another embodiment, this invention provides an isolated antibody, or an antigen binding portion thereof, that specifically binds to Notch-1, comprising

30 (i) a light chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:12, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:12 is

modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified;

(ii) a light chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:13, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:13 is
5 modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified; and

(iii) a light chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:14, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO: 14 is
10 modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified.

In one aspect of this embodiment, of the 12 possible amino acid residue modifications (as described above in this embodiment) of the light chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, any of the modifications, except for up to six of the modifications, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof.
15 Preferably, any of the said modifications of the light chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, except for up to five of the modifications, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof. More preferably, any of the said modifications of the light chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, except for up to four of the modification, except for up to three of the modifications, except for up to two of the modifications or
20 except for one modification, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof. Even more preferably, any of the said modifications of the light chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3 is a conservative substitution of the amino acid residue thereof.

In another aspect of this embodiment, none of the light chain variable region
25 CDR1, CDR2 and CDR3 is modified.

In another embodiment, this invention provides an isolated antibody, or an antigen binding portion thereof, that specifically binds to Notch-1, comprising:

(i) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 18, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:18 are modified, preferably, only 3 residues
30 are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified;

(ii) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 19, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:19 are modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified;

5 (iii) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 20, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:20 are modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified;

10 (iv) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 12, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:12 are modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified;

15 (v) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 13, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:13 are modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified; and

20 (vi) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 14, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:14 are modified, preferably, only 3 residues are modified, more preferably, only two residues are modified, even more preferably, only one residue is modified.

In one aspect of this embodiment, of the 24 possible amino acid residue modifications (as described above in this embodiment) of the heavy chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3 and the light chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, any of the modifications, except for up to 12 of the modifications, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof. Preferably, any of the said modifications of the heavy chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3 and the light chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, except for up to 11 of the modifications, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof. More preferably, any of the said modifications of the heavy chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3 and the light chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3, except for up to 10 of the modifications, except for up to 9 of the modifications, except for up to 8 of the modifications, except for up to 7 of the modifications, except for up to 6 of the

modifications, except for up to 5 of the modifications, except for up to four of the modification, except for up to three of the modifications, except for up to two of the modifications or except for one modification, is a conservative substitution of the amino acid residue thereof. Even more preferably, any of the said modifications of the heavy chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3 and the light chain variable regions CDR1, CDR2 and CDR3 is a conservative substitution of the amino acid residue thereof.

In another aspect of this embodiment, none of the light chain CDR and the heavy chain CDRs is modified.

In another embodiment, the inventions provides an isolated monoclonal antibody, or an antigen binding portion thereof, wherein the antibody or antigen binding portion cross-competes or competes for binding to human Notch-1, with an antibody that comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

In another embodiment, the inventions provides an isolated monoclonal antibody, or an antigen binding portion thereof, wherein the antibody or antigen binding portion cross-competes or competes for binding to human Notch-1, with an antibody that comprises:

(i) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 18,

(ii) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 19,

(iii) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 20,

(iv) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 12,

(v) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 13, and

(vi) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 14,

wherein 1-4 amino residues of each of the light chain CDR and the heavy chain CDR may be modified. Preferably, any of the modification of the light chain CDRs and the heavy chain CDRs is a conservative substitution of the amino acid residues thereof. More preferably, none of the light chain CDRs and the heavy chain CDRs is modified.

Determination of CDR regions is well within the skill of the art. It is understood that in some embodiments, CDRs can be a combination of the Kabat and Chothia CDR (also termed "combined CDRs" or "extended CDRs"). In some embodiments, the CDRs are the Kabat CDRs. In other embodiments, the CDRs are the Chothia CDRs. In other words, in embodiments with more than one CDR, the CDRs may be any of Kabat, Chothia, combination CDRs, or combinations thereof.

In one aspect of the embodiments, the antibody is a humanized antibody. In another aspect of the embodiments, the antibody is a fully human antibody. In another aspect of the embodiments, the antibody is a chimeric antibody.

In another aspect of the embodiments, the antibody or the antigen binding portion binds to human Notch-1 with an equilibrium dissociation constant K_D of less than 1×10^{-5} M, preferably less than 1×10^{-6} M, preferably less than 5×10^{-7} M, preferably less than 2×10^{-7} M, preferably less than 1×10^{-7} M, or even more preferably less than 1×10^{-8} M.

In another aspect of the embodiments, the antibody is a mouse antibody. In another aspect of this embodiment, the antibody is humanized, human, or chimeric. Preferably, the antibody is humanized. More preferably, the antibody is fully human antibody.

In another aspect of this embodiment, the antibody is a human full length antibody of subclass IgG₁, IgG₂, IgG₃ or IgG₄. In another aspect of this embodiment, the antibody is a humanized antibody of subclass IgG₁, IgG₂, IgG₃ or IgG₄. In yet another embodiment, the antibody is a chimeric antibody of subclass IgG₁, IgG₂, IgG₃ or IgG₄.

In another embodiment, this invention provides a pharmaceutical composition comprising any of the antibodies or antigen binding portion disclosed herein.

In another embodiment, this invention provides a cell line that recombinantly produces the any of the antibodies or antigen binding portion disclosed herein.

In another embodiment, this invention provides an oligonucleotide encoding either the heavy chain or the light chain any of the antibodies or antigen binding portion disclosed herein.

In another embodiment, this invention provides a method for treating cancer comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the

antibody or the antigen binding portion of the invention, or a pharmaceutical composition thereof.

In another embodiment, this invention provides the antibodies or the antigen binding portion disclosed herein for the use in the treatment of cancer.

5 In another embodiment, this invention provides the use of the antibodies or the antigen binding portion disclosed herein, for the preparation of a medicament for the treatment of cancer.

Brief Description of the Figures/Drawings

10 Figure 1 illustrates the PCR synthesis of the cDNA of a human Notch1 immunogen plasmid N1-NRR-TM(-), as described in Example 1.

Figure 2 illustrates the PCR synthesis of the cDNA of another human Notch1 immunogen plasmid N1-NRR-TM(+), also described in Example 1.

15 Figure 3 illustrates the Notch-1 dependent luciferase reporter assay results of two monoclonal antibodies: mAb N248A and mAb-C, as shown in Example 3.

Figure 4 illustrates that the luciferase reporter assay indicates that mAb N248A inhibit Jagged-1 induced Notch 1 signaling. Hela/Jagged1 cells and N1dP-c16 cells were co-cultured for the luciferase reporter assay. MIgG is a control mouse antibody. The y-axis numbers are luciferase reporter activity readings.

20 Figure 5 is a sequence alignment of the EFG, Lin-A, Lin-B, Lin-C, HD-N and HD-C domains between human Notch1 and human Notch2.

Figure 6A is a Western blot image illustrating that level of NICD (Notch1 intracellular domain) was reduced by mAb N248A in the HPB-ALL cells.

Figure 6B illustrates that growth of HPB-All cells are inhibited by mAb N248A.

25 Figure 7A and 7B illustrates that mAb N248A blocks the expression of Hes1 mRNA and Hes4 mRNA respectively.

Figure 8 illustrates the growth inhibition of HBP-ALL xenograft tumor by mAb N248A. Mice were dosed with mAb as indicated in the figure after tumor grew to 150-300 mm³. Each group contains ten mice with randomized tumor size.

30 Figure 9 illustrates the changes of plasma mAb N248A concentration after a single dose injection of 5 mg/kg in mice. Each data point was calculated based on three mice. $T_{1/2}$ is the half life of N248A in mouse sera.

Figure 10 illustrates the inhibition of NICD in HBP-ALL xenograft tumors after a single dose injection of 5 mg/kg in mice. The Western blot bands of the tumors treated with control antibody D16A were set as 100% intensity, which equals to 0% inhibition.

5

Detailed Description of the Invention

The present disclosure relates to isolated monoclonal antibodies, particularly human monoclonal antibodies and mouse monoclonal antibodies as well as human/mouse chimeric antibodies that bind specifically to Notch-1 with high affinity. The disclosure provides isolated antibodies, methods of making such antibodies, immunconjugates and bispecific molecules comprising such antibodies and pharmaceutical compositions containing the antibodies, immunconjugates or bispecific molecules of the disclosure. The disclosure also relates to methods of using the antibodies, such as to inhibit Notch-1 activation, as well as to treat diseases associated with over activation or over expression of Notch-1, such as abnormal cell growth (e.g. cancer). Accordingly, the disclosure also provides methods of using the anti-Notch-1 antibodies or antigen binding portions thereof to treat various types of abnormal cell growth, such as cancer.

Definitions.

20

The terms "Notch-1" or "Notch1" are used interchangeably, and include variants, isoforms and species homologs of human Notch-1 protein. Native human Notch-1 protein, for example, is made up of a leader peptide, a large epidermal growth factor (EGF)-like repeat region, three Lin12 repeats, a N terminal heterodimerization domain (HD-N), a C terminal heterodimerization domain (HD-C), a transmembrane (TM) sequence and an intracellular domain (NICD). The NCBI/GenBank accession number of the full length human Notch-1 is NM_017617.2

25

The term "Notch-1 negative regulatory region", or "Notch-1 NRR" as used herein, unless otherwise indicated, refers to any native or synthetic polypeptide region of Notch-1 consisting of the three Lin12 domains and the amino acid sequence or sequences located between the three Lin12 domains and the transmembrane domain of Notch-1. In one embodiment, the "Notch-1 NRR" includes the three Lin12 domains and two heterodimerization domains HD-N, and HD-C, wherein the HD-N and HD-C domains of Notch-1 are covalently bonded and not yet cleaved by the furin-like protease (before S1

30

cleavage). In another embodiment, the "Notch-1 NRR" includes the three Lin12 domains and the two heterodimerization domains HD-N, and HD-C, wherein the HD-N and HD-C domains are non-covalently bonded (after S1 cleavage). In one aspect of this embodiment, the S2 site within the HD-C domain has not been cleaved by the ADAM-type metalloproteases. In another particular aspect of this embodiment, the S2 site within the HD-C domain is being cleaved or has already been cleaved by the ADAM-type metalloproteases. (Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300).

The term "immune response" refers to the action of, for example, lymphocytes, antigen presenting cells, phagocytic cells, granulocytes, and soluble macromolecules produced by the above cells or the liver (including antibodies, cytokines, and complement) that results in selective damage to, destruction of, or elimination from the human body of invading pathogens, cells or tissues infected with pathogens, cancerous cells, or, in cases of autoimmunity or pathological inflammation, normal human cells or tissues.

A "signal transduction pathway" refers to the biochemical relationship between a variety of signal transduction molecules that play a role in the transmission of a signal from one portion of a cell to another portion of a cell. As used herein, the phrase "cell surface receptor" includes, for example, molecules and complexes of molecules capable of receiving a signal and the transmission of such a signal across the plasma membrane of a cell. An example of a "cell surface receptor" of the present disclosure is the Notch-1 receptor.

The term "antibody" as referred to herein includes whole antibodies and any antigen binding fragment (*i.e.*, "antigen-binding portion") or single chains thereof. An "antibody" refers to a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds, or an antigen binding portion thereof. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, C_{H1} , C_{H2} and C_{H3} . Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, C_L . The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, referred to complementarily determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, referred

to framework regions (FR). The CDR regions can be determined using the Kabat or Chothia numbering systems, both of which are well known to those of skill in the art. See, e.g. Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antibody portion"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (e.g., Notch-1). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L , V_H , C_L and C_{H1} domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the V_H and C_{H1} domains; (iv) a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a V_H domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H , are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see e.g., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. These antibody fragments may be obtained using any suitable technique, including conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments may be screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

An "isolated antibody", as used herein, is intended to refer to an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (e.g., an isolated antibody that specifically binds Notch-1 is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than Notch-1). An isolated antibody that specifically binds Notch-1 may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as Notch-1 molecules from other species. Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals.

The terms "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used herein refer to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope.

The term "humanized antibody" is intended to refer to antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences. Additional framework region modifications may be made within the human framework sequences.

The term "chimeric antibody" is intended to refer to antibodies in which the variable region sequences are derived from one species and the constant region sequences are derived from another species, such as an antibody in which the variable region sequences are derived from a mouse antibody and the constant region sequences are derived from a human antibody.

The terms "human antibody", or "fully human antibody", as used herein, are intended to include antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from human germline immunoglobulin sequences. The human antibodies of the disclosure or antigen binding portions thereof may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*). However, the term "human antibody", as used herein, is not intended to include antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences.

The terms "human monoclonal antibody" or "fully human monoclonal antibody" refer to antibodies displaying a single binding specificity which have variable regions in

which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In one embodiment, the human monoclonal antibodies are produced by a hybridoma which includes a B cell obtained from a transgenic nonhuman animal, e.g., a transgenic mouse, having a genome comprising a human heavy chain transgene and a light chain transgene fused to an immortalized cell.

The term "human antibody derivatives" refers to any modified form of the human antibody, e.g., a conjugate of the antibody and another agent or antibody.

The term "recombinant human antibody", as used herein, includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom (described further below), (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, e.g., from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

The term "compete", as used herein with regard to an antibody, refers to when a first antibody, or an antigen-binding portion thereof, competes for binding with a second antibody, or an antigen-binding portion thereof, where binding of the first antibody with its cognate epitope is detectably decreased in the presence of the second antibody compared to the binding of the first antibody in the absence of the second antibody. The alternative, where the binding of the second antibody to its epitope is also detectably decreased in the presence of the first antibody, can, but need not be the case. That is, a first antibody can inhibit the binding of a second antibody to its epitope without that second antibody inhibiting the binding of the first antibody to its respective

epitope. However, where each antibody detectably inhibits the binding of the other antibody with its cognate epitope or ligand, whether to the same, greater, or lesser extent, the antibodies are said to "cross-compete" with each other for binding of their respective epitope(s). For instance, cross-competing antibodies can bind to the epitope, or portion of the epitope, to which the antibodies as disclosed herein bind. Use of both competing and cross-competing antibodies is encompassed by the present disclosure. Regardless of the mechanism by which such competition or cross-competition occurs (e.g., steric hindrance, conformational change, or binding to a common epitope, or portion thereof, and the like), the skilled artisan would appreciate, based upon the teachings provided herein, that such competing and/or cross-competing antibodies are encompassed and can be useful for the methods disclosed herein.

As used herein, a "major epitope" refers to an epitope, wherein if any one of the amino acid residues of the epitope is replaced by an alanine or a non conservative substitution, the binding affinity of the antibody to the antigen which the epitope belongs to, is decreased by more than 50%.

As used herein, "isotype" or "class" refers to the antibody class (e.g., IgM or IgG) that is encoded by the heavy chain constant region genes. The constant domains of antibodies are not involved in binding to antigen, but exhibit various effector functions. Depending on the amino acid sequence of the heavy chain constant region, a given human antibody or immunoglobulin can be assigned to one of five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM. The structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well-known. Of the various human immunoglobulin classes, only human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, and IgM are known to activate complement. Human IgG1 and IgG3 are known to mediate ADCC in humans.

As used herein, "subclass" refers to the further specification within an isotype of the heavy chain constant region gene, such as, for example, the IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 subclasses within the IgG isotype.

As used herein, the term "compound" or "pharmaceutical compound" includes antibodies, antigen-binding portions thereof, immunoconjugates, and bispecific molecules.

The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen."

The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. For example, the FcR can be a native sequence human FcR. Furthermore, the FcR can be one that binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcγRIV subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain (see, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); and de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., *Immunol.*, 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

As used herein, an antibody that "specifically binds to human Notch-1" is intended to refer to an antibody that binds to human Notch-1 with a K_D of 1×10^{-5} M or less.

The term " k_{on} ", as used herein, is intended to refer to the on-rate, or association rate of a particular antibody-antigen interaction, whereas the term " k_{off} ", as used herein, is intended to refer to the off-rate, or dissociation rate of a particular antibody-antigen interaction. The term " K_D ", as used herein, is intended to refer to the equilibrium dissociation constant, which is obtained from the ratio of k_{off} to k_{on} (i.e., k_{off}/k_{on}) and is expressed as a molar concentration (M). K_D values for antibodies can be determined using methods well established in the art. One method for determining the K_D of an antibody is by using surface plasmon resonance, typically using a biosensor system such as a Biacore® system.

As used herein, the term "high affinity" for an antibody refers to an antibody having a K_D of 1×10^{-6} M or less.

As used herein, the term "subject" includes any human or nonhuman animal. The term "nonhuman animal" includes all vertebrates, e.g., mammals and non-mammals, such as nonhuman primates, sheep, dogs, cats, horses, cows, chickens, amphibians, reptiles, etc.

Human Notch-1 receptor

Human Notch1 cDNA encodes a protein of 2556 amino acid residues consisting of a leader peptide, 36 EGF-like repeats, negative regulatory region (NRR), a transmembrane (TM) sequence and an intracellular domain. (Vardar et al., Biochemistry 2003, 41: 7061-7067; Sanchez-Irizarry et al., Mol. Cell. Biol. 2004, 24: 9265-9273; Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300). The Notch-1 NRR starts from amino acid residue 1447 and ends at 1734. The Notch-1 NRR consists of LNR-A (Notch-1 AA residues 1447-1483), LNR-B (Notch-1 AA residues 1484-1525), LNR-C (Notch-1 AA residues 1526-1565), N-terminal heterodimerization domain (HD-N, Notch-1 AA residues 1566-1665) and C-terminal heterodimerization domain (HD-C, Notch-1 AA residues 1666 to 1734).

The antibodies of the disclosure are characterized by particular functional features or properties of the antibodies. For example, the antibodies bind specifically to human Notch-1 with a K_D of 1×10^{-5} M or less. Preferably, an antibody of the disclosure binds to Notch-1 with high affinity, for example with a K_D of 1×10^{-6} M or less, more preferably with a K_D of 1×10^{-7} M or less, even more preferably, with a K_D of 1×10^{-8} M or less.

Assays to evaluate the binding ability of the antibodies toward Notch-1 include, but are not limited to ELISAs, Western blots, RIAs, and flow cytometry analysis. The binding kinetics (e.g., binding affinity) of the antibodies also can be assessed by assays known in the art, such as by Biacore analysis.

Monoclonal Antibody mAb N248A.

One illustrative antibody of the disclosure is the mouse monoclonal antibody N248A, generated, isolated, tested and structurally characterized as described in

Examples 1-3 and 8. Table 1 lists the amino acid sequences of various regions of mAb N248A and other sequences disclosed herein.

Table 1

	Sequence	SEQ ID Number
Nucleotide sequence of immunogen Notch1-NRR-TM(-)	ATGCCGCCGCTCCTGGCACCTCTGCTCTGC CTGGCACTGCTACCCGCTCTCGCTGCACGA GGTCCGCGATGCTCCCAACCAGGTGAGACC TGCCTGAATGGAGGTAAGTGTGAAGCAGCC AATGGCACGTGCCTGTGCCTGGGCCCCCTTC ACGGGCCCCGAATGCCAGTTCCCGGCCAGC AGCCCCTGCCTGGGCGGCAACCCCTGCTAC AACCAGGGGACCTGTGAGCCCACATCCGAG AGCCCCTTCTACCGTTGCCTGTGCCCCGCCA AATTCAACGGGCTCTTGTGCCACATCCTGGA CTACAGCTTCGGGGGTGGGGCCGGGCGCG ACATCCCCCGCCGCTGATCGAGGAGGCGT GCGAGCTGCCCGAGTGCCAGGAGGACGCG GGCAACAAGGTCTGCAGCCTGCAGTGCAAC AACCACGCGTGCGGCTGGGACGGCGGTGAC TGCTCCCTCAACTTCAATGACCCCTGGAAGA ACTGCACGCAGTCTCTGCAGTGCTGGAAGTA CTTCAGTGACGGCCACTGTGACAGCCAGTG CAACTCAGCCGGCTGCCTCTTCGACGGCTTT GACTGCCAGCGTGCGGAAGGCCAGTGCAAC CCCCTGTACGACCAGTACTGCAAGGACCACT TCAGCGACGGGCACTGCGACCAGGGCTGCA ACAGCGCGGAGTGCGAGTGGGACGGGCTG GACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGAGGCTG GCGGCCGGCACGCTGGTGGTGGTGGTGCT GATGCCGCCGGAGCAGCTGCGCAACAGCTC CTTCCAATTCTGCGGGAGCTCAGCCGCGT GCTGCACACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGAC	1

	GCACACGGCCAGCAGATGATCTTCCCCTACT ACGGCCGCGAGGAGGAGCTGCGCAAGCAC CCCATCAAGCGTGCCGCCGAGGGCTGGGCC GCACCTGACGCCCTGCTGGGCCAGGTGAAG GCCTCGCTGCTCCCTGGTGGCAGCGAGGGT GGGCGGCGGGCGGAGGGAGCTGGACCCCAT GGACGTCCGCGGCTCCATCGTCTACCTGGA GATTGACAACCGGCAGTGTGTGCAGGCCTC CTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCACCGACGT GGCCGCATTCTGTTGGGAGCGCTCGCCTCGCT GGGCAGCCTCAACATCCCCTACAAGATCGA GGCCGTGCAGAGTGAGACCGTGGAGCCGCC CCCGCCGGCGCAGAAGCGCCGGCGGCAGC ATGGCCAGCTCTGGTTCCTGAGGGCTTCAA AGTGTCTGAGGCCAGCAAGAAGAAGCGGCG GGAGCCCCTCGGCGAGGACTCCGTGGGCCT CAAGCCCCTGAAGAACGCTTCAGAC	
Amino acid sequence of immunogen Notch1- NRR-TM(-)	MPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCL NGGKCEAANGTCLCLGPFTGPECQFPASSPC LGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNG LLCHILDYSFGGGAGRDIPPLIEEACELPECQ EDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFND PWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDQNSAGCL FDGFDCQRAEGQCNPPLYDQYCKDHFSDGHC DQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVV VVLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKR DAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAA PDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPM DV RGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFL GALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQKRR RQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSV GLKPLKNASD	2

Nucleotide sequence of immunogen Notch1- NRR-TM(+)	ATGCCTCCGCTCCTGGCACCTCTGCTCTGCC TGGCACTGCTACCCGCTCTCGCTGCACGAG GTCCGCGATGCTCCCAACCAGGTGAGACCT GCCTGAATGGAGGTAAGTGTGAAGCAGCCA ATGGCACGTGCCTGTGCCTGGGCCCCCTTCA CGGGCCCCGAATGCCAGTTCCCGGCCAGCA GCCCCCTGCCTGGGCGGCAACCCCTGCTACA ACCAGGGGACCTGTGAGCCCACATCCGAGA GCCCCCTTCTACCGTTGCCTGTGCCCCGCCAA ATTCAACGGGCTCTTGTGCCACATCCTGGAC TACAGCTTCGGGGGTGGGGCCGGGCGCGA CATCCCCCGCCGCTGATCGAGGAGGCGTG CGAGCTGCCCCGAGTGCCAGGAGGACGCGG GCAACAAGGTCTGCAGCCTGCAGTGCAACA ACCACGCGTGCGGCTGGGACGGCGGTGACT GCTCCCTCAACTTCAATGACCCCTGGAAGAA CTGCACGCAGTCTCTGCAGTGCTGGAAGTAC TTCAGTGACGGCCACTGTGACAGCCAGTGC AACTCAGCCGGCTGCCTCTTCGACGGCTTTG ACTGCCAGCGTGCGGAAGGCCAGTGCAACC CCCTGTACGACCAGTACTGCAAGGACCACTT CAGCGACGGGCACTGCGACCAGGGCTGCAA CAGCGCGGAGTGCGAGTGGGACGGGCTGG ACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGAGGCTGG CGGCCGGCACGCTGGTGGTGGTGGTGCTGA TGCCGCCGGAGCAGCTGCGCAACAGCTCCT TCCACTTCCTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGC TGCACACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGC ACACGGCCAGCAGATGATCTTCCCCTACTAC GGCCGCGAGGAGGAGCTGCGCAAGCACCC CATCAAGCGTGCCGCCGAGGGCTGGGCCGC ACCTGACGCCCTGCTGGGCCAGGTGAAGGC CTCGCTGCTCCCTGGTGGCAGCGAGGGTGG	3
---	--	---

	GCGGCGGCGGAGGGAGCTGGACCCCATGG ACGTCCGCGGCTCCATCGTCTACCTGGAGAT TGACAACCGGCAGTGTGTGCAGGCCTCCTC GCAGTGCTTCCAGAGTGCCACCGACGTGGC CGCATTCTGGGAGCGCTCGCCTCGCTGGG CAGCCTCAACATCCCCTACAAGATCGAGGCC GTGCAGAGTGAGACCGTGGAGCCGCCCCCG CCGGCGCAGCTGCACTTCATGTACGTGGCG GCGGCCGCCTTTGTGCTTCTGTTCTTCGTGG GCTGCGGGGTGCTGCTGTCC	
Amino acid sequence of immunogen Notch1- NRR-TM(+)	MPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCL NGGKCEAANGTCLCLGPFTGPECQFPASSPC LGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNG LLCHILDYSFGGGAGRDIPPLIEEACELPECQ EDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFND PWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSSQNSAGCL FDGFDCQRAEGQCNPPLYDQYCKDHFSDGHC DQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVV VVLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKR DAHGQQMIFPYYGREEELRKHPKRAAEGWAA PDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPM DV RGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFL GALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHF MYVAAAFAVLLFFVGCGLLS	4
Nucleotide sequence of heavy chain variable region of mAb N248A	CAGGTTCACTGTCAGCAGTCTGGAGCTGAG CTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATAT CCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAA CTACTGGATGGAGTGGGTAAAGCAGAGGCC TGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATT TTACCTGGAAGGGGTAGAACTAACTACAATG AGAACTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGC	5

	AGATACATCCTCCAACACAGTCTACATGCAA CTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCG TCTATTACTGTGCAAGATTCCACAGCTCGGC CTATTACTATACTATGGACTACTGGGGTCAAA GAACCTCGGTCACCGTCTCCTCA	
Amino acid sequence of Heavy chain variable region of mAb N248A	<u>QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSNY</u> <u>WMEWVKQRP</u> <u>GHGLEWIGEILPGRGRTNYNEN</u> <u>FKG</u> <u>KATFTADTSSNTVYMQ</u> <u>LN</u> <u>SLTSEDSAVYY</u> <u>CARFHSSAYYYTMDYWGQRTSVTVSS</u>	6
Nucleotide sequence of light chain variable region of mAb N248A	CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCA CCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCAC TTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACT AGTAACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAAC CAGATCATTATTTCACTGGTCTAATAGGTGGT ACCAACAACCGAGCTCCAGGTATTCCTGCCA GATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGC TGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGA GGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGG TACAGCAACCACTGGGTGTTGGGTGGAGGA ACCAAACCTGACTGTCCTA	7
Amino acid sequence of Light chain variable region of mAb N248A	<u>QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTS</u> <u>NYANWVQE</u> <u>KPDHLFTGLIGGTNNRAPGIPARF</u> <u>SGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNH</u> <u>WVFGGGTKLTVL</u>	8
Nucleotide sequence of light chain variable region CDR1 of mAb N248A	CGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACTAGTA ACTATGCCAAC	9
Nucleotide sequence of light chain variable	GGTACCAACAACCGAGCTCCA	10

region CDR2 of mAb N248A		
Nucleotide sequence of light chain variable region CDR3 of mAb N248A	GCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTG	11
Amino acid sequence of light chain variable region CDR1 of mAb N248A	RSSTGAVTTSNYAN	12
Amino acid sequence of light chain variable region CDR2 of mAb N248A	GTNNRAP	13
Amino acid sequence of light chain variable region CDR3 of mAb N248A	ALWYSNHWV	14
Nucleotide sequence of heavy chain variable region CDR1 of mAb N248A	AACTACTGGATGGAG	15
Nucleotide sequence of heavy chain variable region CDR2 of mAb N248A	GAGATTTTACCTGGAAGGGGTAGAACTAACT ACAATGAGAACTTCAAGGGC	16
Nucleotide sequence of heavy chain variable region CDR3 of mAb N248A	TTCCACAGCTCGGCCTATTACTATACTATGG ACTAC	17
Amino acid sequence of heavy chain variable region CDR1 of mAb	NYWME	18

N248A		
Amino acid sequence of heavy chain variable region CDR2 of mAb N248A	EILPGRGRTNYNENFKG	19
Amino acid sequence of heavy chain variable region CDR3 of mAb N248A	FHSSAYYYTMDY	20
Nucleotide sequence of human Notch-1 NRR (LinA, LinB Lin C, HD-N and HD-C)	<u>GAGGAGGCGTGCGAGCTGCCCGAGTGCCA</u> <u>GGAGGACGCGGGCAACAAGGTCTGCAGCCT</u> <u>GCAGTGCAACAACCACGCGTGCGGCTGGGA</u> <u>CGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTTCAATGAC</u> CCCTGGAAGAACTGCACGCAGTCTCTGCAGT GCTGGAAGTACTTCAGTGACGGCCACTGTGA CAGCCAGTGCAACTCAGCCGGCTGCCTCTT CGACGGCTTTGACTGCCAGCGTGCGGAAGG <u>CCAGTGCAACCCCCTGTACGACCAGTACTGC</u> <u>AAGGACCACTTCAGCGACGGGCACTGCGA</u> <u>CCAGGGCTGCAACAGCGCGGAGTGCGAGTG</u> <u>GGACGGGCTGGACTGTGCGGAGCATGTACC</u> CGAGAGGCTGGCGGCCGGCACGCTGGTGG TGGTGGTGCTGATGCCGCCGGAGCAGCTGC GCAACAGCTCCTTCCACTTCCTGCGGGAGCT CAGCCGCGTGCTGCACACCAACGTGGTCTT CAAGCGTGACGCACACGGCCAGCAGATGAT CTTCCCCCTACTACGGCCGCGAGGAGGAGCT GCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGCCGCCGA GGGCTGGGCGGCACCTGACGCCCTGCTGG GCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCCTGGTG GCAGCGAGGGTGGGCGGCGGCGGAGGGAG <u>CTGGACCCCATGGACGTCCGCGGCTCCATC</u> <u>GTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCAGTGTG</u>	21

	<u>TGCAGGCCTCCTCGCAGTGCTTCCAGAGTG</u> <u>CCACCGACGTGGCCGCATTCCTGGGAGCGC</u> <u>TCGCCTCGCTGGGCAGCCTCAACATCCCCTA</u> <u>CAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGAGACCGT</u> <u>GGAGCCGCCCCCGCCGGCGCAG</u> LinA, LinB, LinC, HD-N and HD-C are marked by alternating underline.	
Amino acid sequence of human Notch-1 NRR (LinA, LinB Lin C, HD-N and HD-C)	<u>EEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWD</u> <u>GGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHC</u> <u>DSQCNSAGCLFDGFDCCQRAEGQCNPPLYDQY</u> <u>CKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHV</u> PERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFHFLRELS RVLHTNVVFKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKH PIKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGR <u>RRRELDPMDVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCF</u> <u>QSATDVA AFLGALASLGSLNIPYKIEAVQSETV</u> <u>EPPPPAQ</u> LinA, LinB, LinC, HD-N and HD-C are marked by alternating underline and grey shade.	22

As shown in Example 4, mAb N248A has a K_D of less than 0.33×10^{-6} M.

As shown in Example 5, it was shown that mAb N248A binds at least two distinguishable Notch-1 epitopes, one epitope is within the Lin-A domain and the other epitope is within the HD-C domain.

As shown in Example 6, mAb N248A inhibits both T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and breast cancer cell growth in cell culture.

As shown in Example 7, mAb N248A also inhibits T-cell lymphoblastic leukemia in murine xenograft tumor model.

Anti Notch-1 antibodies that bind to at least two distinguished epitopes in Notch-1 Lin-A domain and Notch-1 HD-C domain.

It is within the contemplation of the current invention, that antibodies that bind to the Notch-1 Lin-A and HD-C domain with a high affinity will reduce Notch-1 signal

transduction, and therefore may demonstrate biological activity in vitro and in vivo to inhibit cancer cell growth, in particular, T-ALL cancer cell growth. Such antibodies may be produced following general methods known to those of ordinary skill in the art. In one embodiment, such antibodies can be produced through immunization of a mouse with an immunogen comprising the Notch-1 LinA domain and the Notch-1 HD-C domain, as shown in Examples 1 and 2, followed by hybridoma cloning of the antibodies thus generated, and assaying the cloned antibodies by ELISA assay, as shown in Example 2. The Notch-1 binding affinity of the antibodies selected according to the ELISA assay can be measured on a surface plasma resonance Biacore 3000 instrument, as shown in Example 4.

The anti Notch-1 antibodies of the current invention, wherein the antibodies that bind to the Notch-1 LinA domain and Notch-1 HD-C domain can be produced by any other methods known in the art other than described in the above paragraph. The route and schedule of immunization of the host animal are generally in keeping with established and conventional techniques for antibody stimulation and production, as further described herein. General techniques for production of human and mouse antibodies are known in the art and/or are described herein.

Anti Notch-1 antibodies generated by hybridoma technologies.

It is within the contemplation of the current invention that that any mammalian subject including humans or antibody producing cells therefrom can be manipulated to serve as the basis for production of mammalian, including human, hybridoma cell lines. Typically, the host animal is inoculated intraperitoneally, intramuscularly, orally, subcutaneously, intraplantar, and/or intradermally with an amount of immunogen, including as described herein.

Hybridomas can be prepared from the lymphocytes and immortalized myeloma cells using the general somatic cell hybridization technique of Kohler, B. and Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497 or as modified by Buck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381 (1982). Available myeloma lines, including but not limited to X63-Ag8.653 and those from the Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, may be used in the hybridization. Generally, the technique involves fusing myeloma cells and lymphoid cells using a fusogen such as polyethylene glycol, or by electrical means well known to those skilled in the art. After the fusion, the cells are separated from the fusion medium

and grown in a selective growth medium, such as hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) medium, to eliminate unhybridized parent cells. Any of the media described herein, supplemented with or without serum, can be used for culturing hybridomas that secrete monoclonal antibodies. As another alternative to the cell fusion technique, EBV

5 immortalized B cells may be used to produce the Notch-1 monoclonal antibodies of the subject invention. The hybridomas are expanded and subcloned, if desired, and supernatants are assayed for anti-immunogen activity by conventional immunoassay procedures (e.g., radioimmunoassay, enzyme immunoassay, or fluorescence immunoassay).

10 Hybridomas that may be used as a source of antibodies encompass all derivatives, progeny cells of the parent hybridomas that produce monoclonal antibodies specific for Notch-1, or a portion thereof.

Hybridomas that produce such antibodies may be grown in vitro or in vivo using known procedures. The monoclonal antibodies may be isolated from the culture media

15 or body fluids, by conventional immunoglobulin purification procedures such as ammonium sulfate precipitation, gel electrophoresis, dialysis, chromatography, and ultrafiltration, if desired. Undesired activity, if present, can be removed, for example, by running the preparation over adsorbents made of the immunogen attached to a solid phase and eluting or releasing the desired antibodies off the immunogen. Immunization

20 of a host animal with a human Notch-1, or a fragment containing the target amino acid sequence conjugated to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, e.g., keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-

25 hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl_2 , or $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, where R and R^1 are different alkyl groups, can yield a population of antibodies (e.g., monoclonal antibodies).

Humanization of anti Notch-1 antibodies generated by immunization in a host animal.

30 It is within the contemplation of the current invention that anti Notch-1 antibodies of the invention wherein the antibodies are generated by immunization in a host animal can be manipulated in many ways to increase its biological activity and pharmaceutical properties. One way of such manipulation is humanization.

There are four general steps to humanize a monoclonal antibody. These are: (1) determining the nucleotide and predicted amino acid sequence of the starting antibody light and heavy variable domains (2) designing the humanized antibody, i.e., deciding which antibody framework region to use during the humanizing process (3) the actual humanizing methodologies/techniques and (4) the transfection and expression of the humanized antibody. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; and 6,180,370.

A number of "humanized" antibody molecules comprising an antigen-binding site derived from a non-human immunoglobulin have been described, including chimeric antibodies having rodent or modified rodent V regions and their associated CDRs fused to human constant domains. See, for example, Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1987), and Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). Other references describe rodent CDRs grafted into a human supporting framework region (FR) prior to fusion with an appropriate human antibody constant domain. See, for example, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al. *Science* 239:1534-1536 (1988), and Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986). Another reference describes rodent CDRs supported by recombinantly engineered rodent framework regions. See, for example, European Patent Publication No. 0519596. These "humanized" molecules are designed to minimize unwanted immunological response toward rodent anti-human antibody molecules which limits the duration and effectiveness of therapeutic applications of those moieties in human recipients. For example, the antibody constant region can be engineered such that it is immunologically inert (e.g., does not trigger complement lysis). See, e.g. PCT Publication No. PCT/GB99/01441; UK Patent Application No. 9809951.8. Other methods of humanizing antibodies that may also be utilized are disclosed by Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 (1991) and in U.S. Patent Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; and 6,350,861; and in PCT Publication No. WO 01/27160.

Human anti Notch-1 antibodies.

It is within the contemplation of the current invention that fully human anti Notch-1 antibodies may be obtained by using commercially available mice that have been engineered to express specific human immunoglobulin proteins. Transgenic animals

that are designed to produce a more desirable (e.g., fully human antibodies) or more robust immune response may also be used for generation of humanized or human antibodies. Examples of such technology are Xenomouse™ from Abgenix, Inc. (Fremont, CA) and HuMAb-Mouse® and TC Mouse™ from Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

It is also within the contemplation of the current invention that fully human anti Notch-1 antibodies may be obtained recombinantly following general methods of phage display technology. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; and 6,265,150; and Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994).

Alternatively, the phage display technology (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)) 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; for review see, e.g., Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies 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 essentially following the techniques described by Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). In a natural immune response, antibody genes accumulate mutations at a high rate (somatic hypermutation). Some of the changes introduced will confer higher affinity, and B cells displaying high-affinity surface immunoglobulin are preferentially replicated and differentiated during subsequent antigen challenge. This natural process can be mimicked by employing the technique known as "chain shuffling." (Marks et al., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). In this method, the affinity of

"primary" human antibodies obtained by phage display can be improved by sequentially replacing the heavy and light chain V region genes with repertoires of naturally occurring variants (repertoires) of V domain genes obtained from unimmunized donors. This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the pM-nM range. A strategy for making very large phage antibody repertoires (also known as "the mother-of-all libraries") has been described by Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266 (1993).

Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from rodent antibodies, where the human antibody has similar affinities and specificities to the starting rodent antibody. According to this method, which is also referred to as "epitope imprinting", the heavy or light chain V domain gene of rodent antibodies obtained by phage display technique is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating rodent-human chimeras. Selection on antigen results in isolation of human variable regions capable of restoring a functional antigen-binding site, i.e., the epitope governs (imprints) the choice of partner. When the process is repeated in order to replace the remaining rodent V domain, a human antibody is obtained (see PCT Publication No. WO 93/06213). Unlike traditional humanization of rodent antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no framework or CDR residues of rodent origin.

Although the above discussion pertains to humanized and human antibodies, the general principles discussed are applicable to customizing antibodies for use, for example, in dogs, cats, primate, equines and bovines. One or more aspects of humanizing an antibody described herein may be combined, e.g., CDR grafting, framework mutation and CDR mutation.

Engineered and modified anti Notch-1 antibodies made recombinantly.

In general, antibodies may be made recombinantly by placing the DNA sequences of the desired antibody into expression vectors followed by transfection and expression in host cells, including but not limited to E. coli cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein. PCT Patent Publication No. WO 87/04462. Other host cells, such as transgenic plant cells or transgenic milk cells may also be used. See, for

example, Peeters, et al. *Vaccine* 19:2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65 (1995); and Pollock, et al., *J Immunol Methods* 231:147(1999).

An antibody may also be modified recombinantly. For example, the DNA of the human heavy and light chain constant regions may be used in place of the homologous murine sequences of the murine antibody DNA, Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851 (1984), or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In similar manner, "chimeric" or "hybrid" antibodies can be prepared that have the binding specificity of an anti Notch-1 monoclonal antibody herein.

Antibody variable regions can also be modified by CDR grafting. Because CDR sequences are responsible for most antibody-antigen interactions, it is possible to express recombinant antibodies that mimic the properties of specific naturally occurring antibodies by constructing expression vectors that include CDR sequences from the specific naturally occurring antibody grafted onto framework sequences from a different antibody with different properties (see, e.g., Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.*)

Accordingly, another aspect of the disclosure pertains to an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 19 and 20, respectively, and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 12, 13 and 14 respectively. Thus, such antibodies contain the V_H and V_L CDR sequences of the monoclonal antibodies N248A, yet may contain different framework sequences from these antibodies. Such framework sequences can be obtained from public DNA databases or published references that include germline antibody gene sequences.

Another type of variable region modification is to mutate amino acid residues within the V_H and/or V_L CDR1, CDR2 and/or CDR3 regions to thereby improve one or more binding properties (e.g., affinity) of the antibody of interest. Site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis can be performed to introduce the

mutation(s) and the effect on antibody binding, or other functional property of interest, can be evaluated in *in vitro* or *in vivo* assays as described herein. Typically, conservative modifications (as discussed below) are introduced. The mutations may be amino acid substitutions, additions or deletions. Moreover, typically no more than one,
5 two, three, four or five residues within a CDR region are altered.

Conservative substitution and antibody affinity maturation will be discussed in more details in later paragraphs.

Mapping of antigen epitopes that an antibody binds to.

10 The binding epitopes of monoclonal antibodies on an antigen may be mapped by a number of methods depending on the type of antigen-antibody interactions.

If an antibody binds to a single epitope consisting of sequential amino acid residues in an antigen, whose binding usually is not affected by antigen conformational changes, the binding epitope is called a linear epitope. A peptide scanning method is
15 commonly used to identify linear binding epitopes (see Journal of Immunological Methods, Volume 315, Issues 1-2, pages 11-18, August 2006), which requires synthesizing a series of overlapping 10-15mer peptides that cover the entire length of the antigen sequence. The peptides are arrayed on a protein-cross-linking membrane in duplicate dotted format. Antibody binding affinity to the peptide array is analyzed similar
20 to ELISA. The peptides-arrayed membrane is first incubated in 1 X PBST with 5% fetal calf serum to block nonspecific binding, then incubated with testing antibodies or nonspecific control antibody followed by incubation with HRP-labeled secondary antibody. The antibody binding strength is read out using a chemiluminescence imaging instrument.

25 Alternatively, a linear binding epitope may be identified using antigen protein domains displayed on yeast cell surface (see Journal of Molecular Biology, 365(1), 196-

200, January 2007) or using antigen protein fragments displayed on bacterial cell surface (see FEMS Microbiol. Lett., 226(2), 347-353, September, 2003; also see Nature Methods, 5(12), 1039-1045, November 2008), followed by flow-cytometric sorting or FACS.

5 Limited proteolysis of peptide antigen and antibody complex, combined with mass spectrometry, may provide another approach to locate linear binding epitopes (see Methods Mol. Biol., 524, 87-101, 2009). Antigen and antibody are mixed and incubated at appropriate conditions to form a binding complex, which is digested by protease under controlled temperature and time. The bound reaction mixture is then
10 passed through a protein-A affinity column to retain the antibody bound with an antigen epitope fragment, which is analyzed by mass spectrometry after eluted from the column.

 Mapping of conformational epitopes depends on the interaction of antibody to antigen in its native conformation. A number of techniques have been reported useful in determining conformational epitopes. One of the methods commonly used is amino acid
15 mutagenesis. Individual amino acid residues in the antigen protein speculated to bind with the antibody are mutated, and the mutated antigen protein is then expressed and subjected to antibody binding analysis to determine if the binding affinity is impaired. However, systematic amino acid mutagenesis across the complete antigen protein sequence is laborious. To narrow down the regions of antigen protein that interact with
20 antibody, substitution of an individual antigen domain by a closely related protein domain can be a useful method (see J. Biol. chem., 274 (14) 9617-9626, April 1999).

 Shotgun mutagenesis mapping was developed to overcome the shortcomings of conventional amino acid mutagenesis (see J. American Chem. Soc, 131, 6952-6954, 2009). This method utilizes a comprehensive mutation library made from antigen cDNA,
25 with each plasmid clone containing a unique point mutation and the entire mutation

library covering every amino acid of the antigen coding region. The library of plasmid clones are transfected in HEK-293T or other human cells, and the cells are then arrayed in 384-well microplates. Antibody binding activity is assayed after fixation of cells on the microplate. If amino acid mutations caused a loss of reactivity, it is identified as an antibody binding epitope.

Cocrystalization of antigen-antibody complex, X-ray diffraction and structural analysis gives direction visualization of antigen-antibody interaction. When combined with amino acid mutagenesis, the technologies would provide powerful evidence and vivid picture for antibody binding epitopes. However, cocrystalization and structural analysis are technically challenging, requires large quantity of purified antigen and antibody, and can be a time-consuming trial and error process.

In order to make an anti Notch-1 antibody that binds to a epitope or a specified set of epitopes, one can generate anti Notch-1 antibodies, then determine the epitope or the set of epitopes that each of these antibodies binds to according to the above mapping method generally known in the art. One can then select those anti Notch-1 antibodies that bind to the specific epitope or the specific set of epitopes.

Conservative substitution

As discussed previously, an antibody may also be modified recombinantly by conservative substitution of one or more of the amino acid residues of the antibody or by one or more deletions or additions of amino acids to that of the antibody.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody of an

enzyme or a polypeptide which increases the half-life of the antibody in the blood circulation.

Substitution variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 2. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 2, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 2: Amino Acid Substitutions

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

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) Non-polar: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polar without charge: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Acidic (negatively charged): Asp, Glu;
- (4) Basic (positively charged): Lys, Arg;
- (5) Residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- (6) Aromatic: Trp, Tyr, Phe, His.

Non-conservative substitutions are made by exchanging a member of one of these classes for another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant cross-linking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability, particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment.

Affinity matured anti Notch-1 antibodies

The invention includes affinity matured embodiments. For example, affinity matured antibodies can be produced by procedures known in the art (Marks et al. (1992) Bio/Technology, 10:779-783; Barbas et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813; Schier et al. (1995) Gene, 169:147-155; Yelton et al. (1995) J. Immunol., 155:1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol., 226:889-896; and PCT Publication No. WO2004/058184).

The following methods may be used for adjusting the affinity of an antibody and for characterizing a CDR. One way of characterizing a CDR of an antibody and/or altering (such as improving) the binding affinity of a polypeptide, such as an antibody, referred to "library scanning mutagenesis". Generally, library scanning mutagenesis works as follows. One or more amino acid positions in the CDR are replaced with two

or more (such as 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20) amino acids using art recognized methods. This generates small libraries of clones (in some embodiments, one for every amino acid position that is analyzed), each with a complexity of two or more members (if two or more amino acids are substituted at every position). Generally, the library also includes a clone comprising the native (unsubstituted) amino acid. A small number of clones, e.g., about 20-80 clones (depending on the complexity of the library), from each library are screened for binding affinity to the target polypeptide (or other binding target), and candidates with increased, the same, decreased, or no binding are identified.

10 In some embodiments, every amino acid position in a CDR is replaced, in some embodiments, one at a time, with all 20 natural amino acids using art recognized mutagenesis methods. This generates small libraries of clones, in some embodiments, one for every amino acid position that is analyzed, each with a complexity of 20 members, if all 20 amino acids are substituted at every position.

15 In some embodiments, the library to be screened comprises substitutions in two or more positions, which may be in the same CDR or in two or more CDRs. Thus, the library may comprise substitutions in two or more positions in one CDR. The library may comprise substitution in two or more positions in two or more CDRs. The library may comprise substitution in 3, 4, 5, or more positions, said positions found in two, three, 20 four, five or six CDRs. The substitution may be prepared using low redundancy codons. See, e.g., Table 2 of Balint et al., (1993) Gene 137(1):109-18). Each CDR may be a Kabat CDR, a Chothia CDR, or an extended CDR.

Candidates with improved binding may be sequenced, thereby identifying a CDR substitution mutant which results in improved affinity, which substitution is also referred 25 to an "improved" substitution. Candidates that bind may also be sequenced, thereby identifying a CDR substitution which retains binding.

Multiple rounds of screening may be conducted. For example, candidates each comprising an amino acid substitution at one or more position of one or more CDR, with improved binding are also useful for the design of a second library containing at least 30 the original and substituted amino acid at each improved CDR position (i.e., amino acid position in the CDR at which a substitution mutant showed improved binding). Preparation, and screening or selection of this library is discussed further below.

Library scanning mutagenesis also provides a means for characterizing a CDR, in so far as the frequency of clones with improved binding, the same binding, decreased binding or no binding also provide information relating to the importance of each amino acid position for the stability of the antibody-antigen complex. For example, if a position of the CDR retains binding when changed to all 20 amino acids, that position is identified as a position that is unlikely to be required for antigen binding. Conversely, if a position of CDR retains binding in only a small percentage of substitutions, that position is identified as a position that is important to CDR function. Thus, the library scanning mutagenesis methods generate information regarding positions in the CDRs that can be changed to many different amino acids (including all 20 amino acids), and positions in the CDRs which cannot be changed or which can only be changed to a few amino acids.

Candidates with improved affinity may be combined in a second library, which includes the improved amino acid, the original amino acid at that position, and may further include additional substitutions at that position, depending on the complexity of the library that is desired, or permitted using the desired screening or selection method. In addition, if desired, adjacent amino acid position can be randomized to at least two or more amino acids. Randomization of adjacent amino acids may permit additional conformational flexibility in the mutant CDR, which may in turn, permit or facilitate the introduction of a larger number of improving mutations. The library may also comprise substitution at positions that did not show improved affinity in the first round of screening.

The second library is screened or selected for library members with improved and/or altered binding affinity using any method known in the art, including screening using Biacore surface plasmon resonance analysis, and selection using any method known in the art for selection, including phage display, yeast display, and ribosome display.

Post translational modification of anti Notch-1 antibodies

Antibodies can also be modified by post translational modifications, including, but not limited to glycosylation with different sugars, acetylation, and phosphorylation. Antibodies are glycosylated at conserved positions in their constant regions. The oligosaccharide side chains of the immunoglobulins affect the protein's function (Boyd et

al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) and the intramolecular interaction between portions of the glycoprotein, which can affect the conformation and presented three-dimensional surface of the glycoprotein (Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416).

5 Oligosaccharides may also serve to target a given glycoprotein to certain molecules based upon specific recognition structures. Glycosylation of antibodies has also been reported to affect antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In particular, CHO cells with tetracycline-regulated expression of $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII), a glycosyltransferase catalyzing formation of bisecting GlcNAc, was reported to
10 have improved ADCC activity (Umana et al., 1999, Mature Biotech. 17:176-180).

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine, asparagine-X-threonine, and asparagine-X-cysteine, where X is any amino acid except proline, are the recognition
15 sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may
20 also be used.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine
25 residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

The glycosylation pattern of antibodies may also be altered without altering the underlying nucleotide sequence. Glycosylation largely depends on the host cell used to express the antibody. Since the cell type used for expression of recombinant glycoproteins, e.g. antibodies, as potential therapeutics is rarely the native cell,
30 variations in the glycosylation pattern of the antibodies can be expected (see, e.g. Hse et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

In addition to the choice of host cells, factors that affect glycosylation during recombinant production of antibodies include growth mode, media formulation, culture

density, oxygenation, pH, purification schemes and the like. Various methods have been proposed to alter the glycosylation pattern achieved in a particular host organism including introducing or overexpressing certain enzymes involved in oligosaccharide production (U.S. Patent Nos. 5,047,335; 5,510,261 and 5,278, 299). Glycosylation, or
5 certain types of glycosylation, can be enzymatically removed from the glycoprotein, for example, using endoglycosidase H (Endo H), N-glycosidase F, endoglycosidase F1, endoglycosidase F2, endoglycosidase F3. In addition, the recombinant host cell can be genetically engineered to be defective in processing certain types of polysaccharides. These and similar techniques are well known in the art.

10 Other methods of post translational modification include using coupling techniques known in the art, including, but not limited to, enzymatic means, oxidative substitution and chelation. Modifications can be used, for example, for attachment of labels for immunoassay.

15 Anti Notch-1 antibodies with modified constant region

In some embodiments of the invention, the antibody comprises a modified constant region, such as a constant region that is immunologically inert or partially inert, e.g., does not trigger complement mediated lysis, does not stimulate antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), or does not activate microglia; or have
20 reduced activities (compared to the unmodified antibody) in any one or more of the following: triggering complement mediated lysis, stimulating antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), or activating microglia. Different modifications of the constant region may be used to achieve optimal level and/or combination of effector functions. See, for example, Morgan et al., Immunology 86:319-324 (1995); Lund et al.,
25 J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969 (1996); Idusogie et al., J. Immunology 164:4178-4184 (2000); Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601 (1989); and Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76 (1998). In some embodiments, the constant region is modified as described in Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; PCT Application No. PCT/GB99/01441; and/or UK Patent Application No. 9809951.8. In
30 other embodiments, the antibody comprises a human heavy chain IgG2 constant region comprising the following mutations: A330P331 to S330S331 (amino acid numbering with reference to the wild type IgG2 sequence). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624. In still other embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation.

In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation by mutating the glycosylated amino acid residue or flanking residues that are part of the N-glycosylation recognition sequence in the constant region. For example, N-glycosylation site N297 may be mutated to A, Q, K, or H. See, Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601 (1989); and Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76 (1998). In some
5 embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. The constant region may be aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically (such as removing carbohydrate by enzyme PNGase), or by expression in a glycosylation deficient host cell.

10 Modifications within the Fc region can typically be used to alter one or more functional properties of the antibody, such as serum half-life, complement fixation, Fc receptor binding, and/or antigen-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, an antibody of the disclosure may be chemically modified (e.g., one or more chemical moieties can be attached to the antibody) or be modified to alter its glycosylation
15 pattern, again to alter one or more functional properties of the antibody. Each of these aspects is described in further detail below. The numbering of residues in the Fc region is that of the EU index of Kabat.

20 In one case, the hinge region of CH1 is modified such that the number of cysteine residues in the hinge region is altered, e.g., increased or decreased. This approach is described further in U.S. Patent No. 5,677,425. The number of cysteine residues in the hinge region of CH1 is altered to, for example, facilitate assembly of the light and heavy chains or to increase or decrease the stability of the antibody.

25 In another case, the Fc hinge region of an antibody is mutated to decrease the biological half life of the antibody. More specifically, one or more amino acid mutations are introduced into the CH2-CH3 domain interface region of the Fc-hinge fragment such that the antibody has impaired *Staphylococcal* protein A (SpA) binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,165,745.

30 In another case, the antibody is modified to increase its biological half life. Various approaches are possible. For example, one or more of the following mutations can be introduced: T252L, T254S, T256F, as described in U.S. Patent No. 6,277,375. Alternatively, to increase the biological half life, the antibody can be altered within the CH1 or CL region to contain a salvage receptor binding epitope taken from two loops of

a CH2 domain of an Fc region of an IgG, as described in U.S. Patent Nos. 5,869,046 and 6,121,022.

In yet other cases, the Fc region is altered by replacing at least one amino acid residue with a different amino acid residue to alter the effector function(s) of the antibody. For example, one or more amino acids selected from amino acid residues 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has an altered affinity for an effector ligand but retains the antigen-binding ability of the parent antibody. The effector ligand to which affinity is altered can be, for example, an Fc receptor or the C1 component of complement. This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260.

In another case, one or more amino acids selected from amino acid residues 329, 331 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has altered C1q binding and/or reduced or abolished complement dependent cytotoxicity (CDC). This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,194,551.

In another example, one or more amino acid residues within amino acid positions 231 and 239 are altered to thereby alter the ability of the antibody to fix complement. This approach is described further in PCT Publication WO 94/29351.

In yet another example, the Fc region is modified to increase the ability of the antibody to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and/or to increase the affinity of the antibody for an Fc γ receptor by modifying one or more amino acids at the following positions: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439. This approach is described further in PCT Publication WO 00/42072. Moreover, the binding sites on human IgG1 for Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII and FcRn have been mapped and variants with improved binding have been described (see Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001)). Specific mutations at positions 256, 290, 298, 333, 334 and 339 were shown to improve binding to Fc γ RIII. Additionally, the following combination mutants were shown to improve Fc γ RIII binding: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A and S298A/E333A/K334A.

In still another example, the glycosylation of an antibody is modified. For example, an aglycosylated antibody can be made (*i.e.*, the antibody lacks glycosylation). Glycosylation can be altered to, for example, increase the affinity of the antibody for antigen. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. Such an approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,714,350 and 6,350,861.

Additionally or alternatively, an antibody can be made that has an altered type of glycosylation, such as a hypofucosylated antibody having reduced amounts of fucosyl residues or an antibody having increased bisecting GlcNac structures. Such altered glycosylation patterns have been demonstrated to increase the ADCC ability of antibodies. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, expressing the antibody in a host cell with altered glycosylation machinery. Cells with altered glycosylation machinery have been described in the art and can be used as host cells in which to express recombinant antibodies of the disclosure to thereby produce an antibody with altered glycosylation. For example, the cell lines Ms704, Ms705, and Ms709 lack the fucosyltransferase gene, FUT8 (α (1,6) fucosyltransferase), such that antibodies expressed in the Ms704, Ms705, and Ms709 cell lines lack fucose on their carbohydrates. The Ms704, Ms705, and Ms709 FUT8^{-/-} cell lines were created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors (see U.S. Patent Publication No. 2004-0110704, and Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng* 87:614-22 (2004)). As another example, European Patent Publication No. EP1,176,195 describes a cell line with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation by reducing or eliminating the α 1,6 bond-related enzyme. EP1,176,195 also describe cell lines which have a low enzyme activity for adding fucose to the N-acetylglucosamine that binds to the Fc region of the antibody or does not have the enzyme activity, for example the rat myeloma cell line YB2/0 (ATCC CRL 1662). PCT Publication WO 03/035835 describes a variant CHO cell line, Lec13 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also

resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (see also Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 (2002)). PCT Publication WO 99/54342 describes cell lines engineered to express glycoprotein-modifying glycosyl transferases (e.g., beta(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies
5 expressed in the engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNAc structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (see also Umana et al., *Nat. Biotech.* 17:176-180 (1999)). Alternatively, the fucose residues of the antibody may be cleaved off using a fucosidase enzyme. For example, the fucosidase alpha-L-fucosidase removes fucosyl residues from antibodies (Tarentino et al., (1975) *Biochem.*
10 14:5516-23 (1975)).

Another modification of the antibodies herein that is contemplated by the disclosure is pegylation. An antibody can be pegylated to, for example, increase the biological (e.g., serum) half life of the antibody. To pegylate an antibody, the antibody, or fragment thereof, typically is reacted with polyethylene glycol (PEG), such as a
15 reactive ester or aldehyde derivative of PEG, under conditions in which one or more PEG groups become attached to the antibody or antibody fragment. Typically, the pegylation is carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive PEG molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer). As used herein, the term "polyethylene glycol" is intended to encompass any of the forms of PEG that have
20 been used to derivatize other proteins, such as mono (C₁ to C₁₀) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain cases, the antibody to be pegylated is an aglycosylated antibody. Methods for pegylating proteins are known in the art and can be applied to the antibodies of the present disclosure. See for example, European Patent Nos. EP 0154316B1 and EP 0401384B1.

25 ~~Other antibody~~ modifications include antibodies that have been modified as described in PCT Publication No. WO 99/58572. These antibodies comprise, in addition to a binding domain directed at the target molecule, an effector domain having an amino acid sequence substantially homologous to all or part of a constant domain of a human immunoglobulin heavy chain. These antibodies are capable of binding the target
30 molecule without triggering significant complement dependent lysis, or cell-mediated destruction of the target. In some embodiments, the effector domain is capable of specifically binding FcRn and/or FcγRIIb. These are typically based on chimeric domains derived from two or more human immunoglobulin heavy chain C_H2 domains.

Antibodies modified in this manner are particularly suitable for use in chronic antibody therapy, to avoid inflammatory and other adverse reactions to conventional antibody therapy.

5 Fusion protein

The invention also encompasses fusion proteins comprising one or more fragments or regions from the antibodies or polypeptides of this invention. In one embodiment, a fusion polypeptide is provided that comprises at least 10 contiguous amino acids of the variable light chain region and/or at least 10 amino acids of the variable heavy chain region of the antibodies of the current invention. In other embodiments, a fusion polypeptide is provided that comprises at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable light chain region and/or at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable heavy chain region. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises a light chain variable region and/or a heavy chain variable region, of the antibodies of the current invention. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises one or more CDR(s) of the antibodies of the current invention. For purposes of this invention, a fusion protein contains one or more antibodies and another amino acid sequence to which it is not attached in the native molecule, for example, a heterologous sequence or a homologous sequence from another region. Exemplary heterologous sequences include, but are not limited to a "tag" such as a FLAG tag or a 6His tag.

A fusion polypeptide can be created by methods known in the art, for example, synthetically or recombinantly.

25

Bispecific Molecules

An antibody of the disclosure, or antigen-binding portions thereof, can be derivatized or linked to another functional molecule, e.g., another peptide or protein (e.g., another antibody or ligand for a receptor) to generate a bispecific molecule that binds to at least two different binding sites or target molecules. The antibody of the disclosure may in fact be derivatized or linked to more than one other functional molecule to generate multispecific molecules that bind to more than two different binding sites and/or target molecules; such multispecific molecules are also intended to be

30

encompassed by the term "bispecific molecule" as used herein. To create a bispecific molecule of the disclosure, an antibody of the disclosure can be functionally linked (e.g., by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other binding molecules, such as another antibody, antibody fragment, peptide or binding mimetic, such that a bispecific molecule results.

Polynucleotides encoding the anti Notch-1 antibodies

The invention also provides isolated polynucleotides encoding the antibodies and peptides of the invention, and vectors and host cells comprising the polynucleotide.

10 In one aspect, the invention provides compositions, such as a pharmaceutical composition, comprising any of the polynucleotides of the invention. In some embodiments, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding the antibody of the invention. In other embodiment, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding any
15 of the antibodies or polypeptides of the invention.

In another aspect, the invention provides a method of making any of the polynucleotides described herein.

Polynucleotides complementary to any such sequences are also encompassed by the present invention. Polynucleotides may be single-stranded (coding or antisense)
20 or double-stranded, and may be DNA (genomic, cDNA or synthetic) or RNA molecules. RNA molecules include HnRNA molecules, which contain introns and correspond to a DNA molecule in a one-to-one manner, and mRNA molecules, which do not contain introns. Additional coding or non-coding sequences may, but need not, be present within a polynucleotide of the present invention, and a polynucleotide may, but need not,
25 be linked to other molecules and/or support materials.

Polynucleotides may comprise a native sequence (i.e., an endogenous sequence that encodes an antibody or a portion thereof) or may comprise a variant of such a sequence. Polynucleotide variants contain one or more substitutions, additions, deletions and/or insertions such that the immunoreactivity of the encoded polypeptide is
30 not diminished, relative to a native immunoreactive molecule. The effect on the immunoreactivity of the encoded polypeptide may generally be assessed as described herein. Variants preferably exhibit at least about 70% identity, more preferably, at least about 80% identity, yet more preferably, at least about 90% identity, and most

preferably, at least about 95% identity to a polynucleotide sequence that encodes a native antibody or a portion thereof.

Two polynucleotide or polypeptide sequences are said to be "identical" if the sequence of nucleotides or amino acids in the two sequences is the same when aligned for maximum correspondence as described below. Comparisons between two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, or 40 to about 50, in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Preferably, the "percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions, wherein the portion of the polynucleotide or polypeptide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid bases or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the reference sequence (i.e. the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

Variants may also, or alternatively, be substantially homologous to a native gene, or a portion or complement thereof. Such polynucleotide variants are capable of hybridizing under moderately stringent conditions to a naturally occurring DNA sequence encoding a native antibody (or a complementary sequence).

Suitable "moderately stringent conditions" include prewashing in a solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50°C-65°C, 5 X SSC, overnight; followed by washing twice at 65°C for 20 minutes with each of 2X, 0.5X and 0.2X SSC containing 0.1 % SDS.

As used herein, "highly stringent conditions" or "high stringency conditions" are those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C;

(2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that, as a result of the degeneracy of the genetic code, there are many nucleotide sequences that encode a polypeptide as described herein. Some of these polynucleotides bear minimal homology to the nucleotide sequence of any native gene. Nonetheless, polynucleotides that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present invention. Further, alleles of the genes comprising the polynucleotide sequences provided herein are within the scope of the present invention. Alleles are endogenous genes that are altered as a result of one or more mutations, such as deletions, additions and/or substitutions of nucleotides. The resulting mRNA and protein may, but need not, have an altered structure or function. Alleles may be identified using standard techniques (such as hybridization, amplification and/or database sequence comparison).

The polynucleotides of this invention can be obtained using chemical synthesis, recombinant methods, or PCR.

For preparing polynucleotides using recombinant methods, a polynucleotide comprising a desired sequence can be inserted into a suitable vector, and the vector in turn can be introduced into a suitable host cell for replication and amplification, as further discussed herein. Polynucleotides may be inserted into host cells by any means known in the art. Cells are transformed by introducing an exogenous polynucleotide by direct uptake, endocytosis, transfection, F-mating or electroporation. Once introduced, the exogenous polynucleotide can be maintained within the cell as a non-integrated vector (such as a plasmid) or integrated into the host cell genome. The polynucleotide

so amplified can be isolated from the host cell by methods well known within the art. See, e.g., Sambrook et al. (1989).

Alternatively, PCR allows reproduction of DNA sequences. PCR technology is well known in the art and is described in U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,800,159, 5 4,754,065 and 4,683,202, as well as PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauswer Press, Boston (1994).

RNA can be obtained by using the isolated DNA in an appropriate vector and inserting it into a suitable host cell. When the cell replicates and the DNA is transcribed into RNA, the RNA can then be isolated using methods well known to those of skill in 10 the art, as set forth in Sambrook et al., (1989), supra, for example.

Suitable cloning vectors may be constructed according to standard techniques, or may be selected from a large number of cloning vectors available in the art. While the cloning vector selected may vary according to the host cell intended to be used, useful cloning vectors will generally have the ability to self-replicate, may possess a single 15 target for a particular restriction endonuclease, and/or may carry genes for a marker that can be used in selecting clones containing the vector. Suitable examples include plasmids and bacterial viruses, e.g., pUC18, pUC19, Bluescript (e.g., pBS SK+) and its derivatives, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, phage DNAs, and shuttle vectors such as pSA3 and pAT28. These and many other cloning vectors are available 20 from commercial vendors such as BioRad, Strategene, and Invitrogen.

Expression vectors generally are replicable polynucleotide constructs that contain a polynucleotide according to the invention. It is implied that an expression vector must be replicable in the host cells either as episomes or as an integral part of the chromosomal DNA. Suitable expression vectors include but are not limited to plasmids, 25 viral vectors, including adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, cosmids, and expression vector(s) disclosed in PCT Publication No. WO 87/04462. Vector components may generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence; an origin of replication; one or more marker genes; suitable transcriptional controlling elements (such as promoters, enhancers and terminator). For 30 expression (i.e., translation), one or more translational controlling elements are also usually required, such as ribosome binding sites, translation initiation sites, and stop codons.

The vectors containing the polynucleotides of interest can be introduced into the host cell by any of a number of appropriate means, including electroporation, transfection employing calcium chloride, rubidium chloride, calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances; microprojectile bombardment; lipofection; and infection (e.g., where the vector is an infectious agent such as vaccinia virus). The choice of introducing vectors or polynucleotides will often depend on features of the host cell.

The invention also provides host cells comprising any of the polynucleotides described herein. Any host cells capable of over-expressing heterologous DNAs can be used for the purpose of isolating the genes encoding the antibody, polypeptide or protein of interest. Non-limiting examples of mammalian host cells include but not limited to COS, HeLa, and CHO cells. See also PCT Publication No. WO 87/04462. Suitable non-mammalian host cells include prokaryotes (such as *E. coli* or *B. subtilis*) and yeast (such as *S. cerevisiae*, *S. pombe*, or *K. lactis*). Preferably, the host cells express the cDNAs at a level of about 5 fold higher, more preferably, 10 fold higher, even more preferably, 20 fold higher than that of the corresponding endogenous antibody or protein of interest, if present, in the host cells. Screening the host cells for a specific binding to Notch-1 or a Notch-1 domain is effected by an immunoassay or FACS. A cell overexpressing the antibody or protein of interest can be identified.

20 Pharmaceutical Compositions

In another aspect, the present disclosure provides a composition, e.g., a pharmaceutical composition, containing one or a combination of monoclonal antibodies, or antigen-binding portion(s) thereof, of the present disclosure, formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier. Such compositions may include one or a combination of (e.g., two or more different) antibodies, or immunoconjugates or bispecific molecules of the disclosure. For example, a pharmaceutical composition of the disclosure can comprise a combination of antibodies (or immunoconjugates or bispecifics) that bind to different epitopes on the target antigen or that have complementary activities.

Pharmaceutical compositions of the disclosure also can be administered in combination therapy, i.e., combined with other agents. For example, the combination therapy can include an anti-Notch1 antibody of the present disclosure combined with at least one other anti-inflammatory or immunosuppressant agent. Examples of

therapeutic agents that can be used in combination therapy are described in greater detail below in the section on uses of the antibodies of the disclosure.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Typically, the carrier is suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, spinal or epidermal administration (e.g., by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound, *i.e.*, antibody, antigen-binding portion thereof, immunoconjugate, or bispecific molecule, may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.

In certain embodiments, the antibodies of the present disclosure may be present in a neutral form (including zwitter ionic forms) or as a positively or negatively-charged species. In some cases, the antibodies may be complexed with a counterion to form a pharmaceutically acceptable salt. Thus, the pharmaceutical compounds of the disclosure may include one or more pharmaceutically acceptable salts.

A "pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt that retains the desired biological activity of the parent compound (e.g. antibody) and does not impart undesired toxicological effects (see *e.g.*, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). For example, the term "pharmaceutically acceptable salt" includes a complex comprising one or more antibodies and one or more counterions, where the counterions are derived from pharmaceutically acceptable inorganic and organic acids and bases.

Examples of such salts include acid addition salts and base addition salts. Acid addition salts include those derived from nontoxic inorganic acids, such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phosphorous and the like, as well as from nontoxic organic acids such as aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanolic acids, hydroxy alkanolic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids and the like. Base addition salts include those derived from alkaline earth metals, such as sodium, potassium, magnesium, calcium and the like, as well as from nontoxic organic amines, such as N,N'-dibenzylethylenediamine, N-methylglucamine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, procaine and the like.

Furthermore, pharmaceutically acceptable inorganic bases include metallic ions. Metallic ions include, but are not limited to, appropriate alkali metal salts, alkaline earth metal salts and other physiological acceptable metal ions. Salts derived from inorganic bases include aluminum, ammonium, calcium, cobalt, nickel, molybdenum, vanadium, manganese, chromium, selenium, tin, copper, ferric, ferrous, lithium, magnesium, manganic salts, manganous, potassium, rubidium, sodium, and zinc, and in their usual valences.

Pharmaceutically acceptable acid addition salts of the antibodies of the present disclosure can be prepared from the following acids, including, without limitation formic, acetic, acetamidobenzoic, adipic, ascorbic, boric, propionic, benzoic, camphoric, carbonic, cyclamic, dehydrocholic, malonic, edetic, ethylsulfuric, fendizoic, metaphosphoric, succinic, glycolic, gluconic, lactic, malic, tartaric, tannic, citric, nitric, ascorbic, glucuronic, maleic, folic, fumaric, propionic, pyruvic, aspartic, glutamic, benzoic, hydrochloric, hydrobromic, hydroiodic, lysine, isocitric, trifluoroacetic, pamoic, propionic, anthranilic, mesylic, orotic, oxalic, oxalacetic, oleic, stearic, salicylic, aminosalicylic, silicate, p-hydroxybenzoic, nicotinic, phenylacetic, mandelic, embonic, sulfonic, methanesulfonic, phosphoric, phosphonic, ethanesulfonic, ethanedisulfonic, ammonium, benzenesulfonic, pantothenic, naphthalenesulfonic, toluenesulfonic, 2-hydroxyethanesulfonic, sulfanilic, sulfuric, nitric, nitrous, sulfuric acid monomethyl ester, cyclohexylaminosulfonic, β -hydroxybutyric, glycine, glycyglycine, glutamic, cacodylate, diaminohexanoic, camphorsulfonic, gluconic, thiocyanic, oxoglutaric, pyridoxal 5-phosphate, chlorophenoxyacetic, undecanoic, N-acetyl-L-aspartic, galactaric and galacturonic acids.

Pharmaceutically acceptable organic bases include trimethylamine, diethylamine, N, N'-dibenzylethylenediamine, chlorprocaine, choline, dibenzylamine, diethanolamine, ethylenediamine, meglumine (N-methylglucamine), procaine, cyclic amines, quaternary ammonium cations, arginine, betaine, caffeine, clemizole, 2-ethylaminoethanol, 2-diethylaminoethanol, 2-dimethylaminoethanol, ethanediamine, butylamine, ethanolamine, ethylenediamine, N-ethylmorpholine, N-ethylpiperidine, ethylglucamine, glucamine, glucosamine, histidine, hydrabamine, imidazole, isopropylamine, methylglucamine, morpholine, piperazine, pyridine, pyridoxine, neodymium, piperidine, polyamine resins, procaine, purines, theobromine, triethylamine, tripropylamine, triethanolamine, tromethamine, methylamine, taurine, cholate, 6-amino-2-methyl-2-

heptanol, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, 2-amino-2-methyl-1-propanol, aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanolic acids, hydroxy alkanolic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids, strontium, tricine, hydrazine, phenylcyclohexylamine, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, bis(2-hydroxyethyl)amino-

5 tris(hydroxymethyl)methane, *N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid, 3-morpholino-2-hydroxypropanesulfonic acid, 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane, 4-morpholinepropanesulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]ethanesulfonic acid, *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-

10 aminoethanesulfonic acid, 4-(*N*-morpholino)butanesulfonic acid, 3-(*N,N*-bis[2-hydroxyethyl]amino)-2-hydroxypropanesulfonic acid, 2-hydroxy-3-[tris(hydroxymethyl)methylamino]-1-propanesulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-(2-hydroxypropanesulfonic acid), piperazine-1,4-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid) dihydrate, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid, *N,N*-bis(2-

15 hydroxyethyl)glycine, *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(4-buthanesulfonic acid), *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid, *N*-tris(Hydroxymethyl)methyl-4-aminobuthanesulfonic acid, *N*-(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid, 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid, 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid, 3-(cyclohexylamino)-1-

20 propanesulfonic acid, *N*-(2-acetamido)iminodiacetic acid, 4-(cyclohexylamino)-1-buthanesulfonic acid, *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine, 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, and trometamol.

A pharmaceutical composition of the disclosure also may include a pharmaceutically acceptable anti-oxidant. Examples of pharmaceutically acceptable

25 antioxidants include: (1) water soluble antioxidants, such as ascorbic acid, cysteine hydrochloride, sodium bisulfate, sodium metabisulfite, sodium sulfite and the like; (2) oil-soluble antioxidants, such as ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), lecithin, propyl gallate, alpha-tocopherol, and the like; and (3) metal chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid

30 (EDTA), sorbitol, tartaric acid, phosphoric acid, and the like.

Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers that may be employed in the pharmaceutical compositions of the disclosure include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures

thereof, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

5 These compositions may also contain adjuvants such as preservatives, wetting agents, emulsifying agents and dispersing agents. Prevention of presence of microorganisms may be ensured both by sterilization procedures, *supra*, and by the inclusion of various antibacterial and antifungal agents, for example, paraben, chlorobutanol, phenol sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include
10 isotonic agents, such as sugars, sodium chloride, and the like into the compositions. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as aluminum monostearate and gelatin.

Pharmaceutically acceptable carriers include sterile aqueous solutions or
15 dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the pharmaceutical compositions of the disclosure is contemplated. Supplementary active compounds can also be
20 incorporated into the compositions.

Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug concentration. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for
25 example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition.
30 Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

5 Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by sterilization microfiltration. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation include, but are not limited to, vacuum drying and freeze-drying (lyophilization) that yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

10 The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will vary depending upon the subject being treated, and the particular mode of administration. The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will generally be that amount of the composition which produces a therapeutic effect. Generally, out of one hundred percent, this amount will range from about 0.01 percent to about ninety-nine percent of active ingredient, preferably from about 0.1 percent to about 70 percent, most preferably from about 1 percent to about 30 percent of active ingredient in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

20 Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the disclosure are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular 25 therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

30 For administration of the antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example

dosages can be 0.3 mg/kg body weight, 1 mg/kg body weight, 3 mg/kg body weight, 5 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1 to 10 mg/kg. An exemplary treatment regime entails administration once per week, once every two weeks, once every three weeks, once every four weeks, once per month, once every 3 months or once every three to 6 months. Dosage regimens for an anti-Notch-1 antibody or antigen binding portion thereof of the disclosure include, for example, 1 mg/kg body weight or 3 mg/kg body weight via intravenous administration, with the antibody being given using one of the following dosing schedules: (i) every four weeks for six dosages, then every three months; (ii) every three weeks; (iii) 3 mg/kg body weight once followed by 1 mg/kg body weight every three weeks.

In some methods, two or more monoclonal antibodies with different binding specificities are administered simultaneously, in which case the dosage of each antibody administered falls within the ranges indicated. Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be, for example, weekly, monthly, every three months or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of antibody to the target antigen in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of about 1 to 1000 $\mu\text{g/ml}$ and in some methods about 25 to 300 $\mu\text{g/ml}$.

Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, human antibodies show the longest half life, followed by humanized antibodies, chimeric antibodies, and nonhuman antibodies. The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, a relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives. In therapeutic applications, a relatively high dosage at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and preferably until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patient can be administered a prophylactic regime.

Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of the present disclosure may be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular

patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level will depend upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of the particular compositions of the present disclosure employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors well known in the medical arts.

10 A "therapeutically effective dosage" of an anti-Notch antibody of the disclosure preferably results in a decrease in severity of disease symptoms, an increase in frequency and duration of disease symptom-free periods, or a prevention of impairment or disability due to the disease affliction. For example, for the treatment of Notch-1-positive tumors, a "therapeutically effective dosage" preferably inhibits cell growth or tumor growth by at least about 20%, more preferably by at least about 40%, even more preferably by at least about 60%, and still more preferably by at least about 80% relative to untreated subjects. The ability of a compound to inhibit tumor growth can be evaluated in an animal model system predictive of efficacy in human tumors. Alternatively, this property of a composition can be evaluated by examining the ability of the compound to inhibit, such inhibition *in vitro* by assays known to the skilled practitioner. A therapeutically effective amount of a therapeutic compound can decrease tumor size, or otherwise ameliorate symptoms in a subject. One of ordinary skill in the art would be able to determine such amounts based on such factors as the subject's size, the severity of the subject's symptoms, and the particular composition or route of administration selected.

A composition of the present disclosure can be administered via one or more routes of administration using one or more of a variety of methods known in the art. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. Routes of administration for antibodies or antigen binding portions thereof of the disclosure include intravenous, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, spinal or other parenteral routes of administration, for example by injection or infusion. The phrase "parenteral administration" as used herein means modes of administration other than enteral and

topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion.

5 Alternatively, an antibody or antigen binding portion thereof of the disclosure can be administered via a non-parenteral route, such as a topical, epidermal or mucosal route of administration, for example, intranasally, orally, vaginally, rectally, sublingually or topically.

10 The active compounds can be prepared with carriers that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to
15 those skilled in the art. See, e.g., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Uses and Methods of the Disclosure

20 The antibodies, particularly the human antibodies, antibody compositions and methods of the present disclosure have numerous *in vitro* and *in vivo* diagnostic and therapeutic utilities involving the diagnosis and treatment of Notch-1 mediated disorders. For example, these molecules can be administered to cells in culture, *in vitro* or *ex vivo*, or to human subjects, e.g., *in vivo*, to treat, prevent and to diagnose a variety of disorders. As used herein, the term "subject" is intended to include human and non-
25 human animals. Non-human animals include all vertebrates, e.g., mammals and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dogs, cats, cows, horses, chickens, amphibians, and reptiles. Preferred subjects include human patients having disorders mediated by Notch-1 activity. The methods are particularly suitable for treating human patients having a disorder associated with aberrant Notch-1 expression or activation.
30 When antibodies to Notch-1 are administered together with another agent, the two can be administered in either order or simultaneously.

Given the specific binding of the antibodies of the disclosure for Notch-1, the antibodies of the disclosure can be used to specifically detect Notch-1 expression on the

surface of cells and, moreover, can be used to purify Notch-1 via immunoaffinity purification.

Furthermore, the antibodies, antibody compositions and methods of the present disclosure can be used to treat a subject with abnormal cell growth, e.g., a cancer. In one particular embodiment, the cancer is T-ALL. In another particular embodiment, the cancer is breast cancer.

Other type of abnormal cell growth that may be treated by the antibodies of the invention include, for example, mesothelioma, hepatobiliary (hepatic and biliary duct), a primary or secondary CNS tumor, a primary or secondary brain tumor, lung cancer (NSCLC and SCLC), bone cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, colon cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, Hodgkin's Disease, cancer of the esophagus, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, prostate cancer, testicular cancer, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, cancer of the bladder, cancer of the kidney or ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system (CNS), primary CNS lymphoma, non hodgkins's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, multiple myeloma, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination of one or more of the foregoing cancers..

Suitable routes of administering the antibody compositions (e.g., human monoclonal antibodies, multispecific and bispecific molecules and immunoconjugates) or antigen binding portions thereof of the disclosure *in vivo* and *in vitro* are well known in the art and can be selected by those of ordinary skill. For example, the antibody compositions can be administered by injection (e.g., intravenous or subcutaneous). Suitable dosages of the molecules used will depend on the age and weight of the subject and the concentration and/or formulation of the antibody composition.

As previously described, human anti- Notch-1 antibodies or antigen binding portions thereof of the disclosure can be co-administered with one or other more

therapeutic agents, e.g., a cytotoxic agent, a radiotoxic agent or an immunosuppressive agent. The antibody can be linked to the agent (as an immunocomplex) or can be administered separate from the agent. In the latter case (separate administration), the antibody can be administered before, after or concurrently with the agent or can be co-administered with other known therapies, e.g., an anti-cancer therapy, e.g., radiation. Such therapeutic agents include, among others, anti-neoplastic agents such as doxorubicin (adriamycin), cisplatin bleomycin sulfate, carmustine, chlorambucil, and cyclophosphamide hydroxyurea which, by themselves, are only effective at levels which are toxic or subtoxic to a patient. Cisplatin can be intravenously administered as a 100 mg/dose once every four weeks and adriamycin is intravenously administered as a 60 to 75 mg/ml dose once every 21 days. Co-administration of the human anti-Notch-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, of the present disclosure with chemotherapeutic agents provides two anti-cancer agents which operate via different mechanisms which yield a cytotoxic effect to human tumor cells. Such co-administration can solve problems due to development of resistance to drugs or a change in the antigenicity of the tumor cells which would render them unreactive with the antibody.

Kits

Also within the scope of the present disclosure are kits comprising the antibody compositions of the disclosure (e.g., human antibodies, bispecific or multispecific molecules, or immunoconjugates) and instructions for use. The kit can further contain one or more additional reagents, such as an immunosuppressive reagent, a cytotoxic agent or a radiotoxic agent, or one or more additional antibodies or antigen binding portions thereof of the disclosure (e.g., a human antibody having a complementary activity which binds to an epitope in the Notch-1 antigen distinct from the first human antibody).

Accordingly, patients treated with antibody compositions of the disclosure can be additionally administered (prior to, simultaneously with, or following administration of a human antibody of the disclosure) another therapeutic agent, such as a cytotoxic or radiotoxic agent, which enhances or augments the therapeutic effect of the human antibodies.

The present disclosure is further illustrated by the following examples which should not be construed as further limiting. The contents of all figures and all

references, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference.

Examples

5 **Example 1:** Generation and expression of Notch1 immunogen

Generation of Notch1 immunogen expression constructs

The immunogen constructs were generated by multiplexing PCR (Fig. 1) for monoclonal antibody (mAb) generation. As illustrated in Fig. 1, the Notch1 immunogen cDNA was synthesized by multiple overlapping PCR using the Notch1 full-length cDNA clone as template (OriGene, Cat. No. TC308883, Rockville, MD) and High Fidelity PCR reagent system following the manufacturer's protocol (Roche, Indianapolis, IN). The recombinant Notch1 immunogen cDNA, containing N-terminal leader peptide, EGF-like repeats 35-36, NRR, (including Lin A, B and C domains and the HD domain) and a small portion of intracellular sequence, was cloned in a Fc-fusion protein vector with Notch1 immunogen fused to the N-terminus of Fc sequence. The Notch1 immunogen plasmid, referred to as N1-NRR-TM(-), contains the cDNA insert shown in sequence 1 in Figure 11, (SEQ ID NO:1), which encodes the immunogen protein shown in sequence 2 in Figure 11 (SEQ ID NO:2).

A similar plasmid was constructed in parallel as shown in Fig. 2, which contains the same sequence as N1-NRR-TM(-) except that the transmembrane (TM) sequence (the last 24 amino acid residues in Sequence 4) was used to replace the intracellular sequence (the last 44 amino acid residues in Sequence 2) of N1-NRR-TM(-). This PCR-amplified Notch1 immunogen cDNA was cloned in pcDNA3.1D/V5-His (Invitrogen). The plasmid was referred to as N1-NRR-TM(+). The nucleic acid sequence and amino acid sequence of N1-NRR-TM(+) is shown as Sequence 3 (SEQ ID NO:3) and 4 (SEQ ID NO:4) in Figure 12.

Expression and purification of Notch1 immunogen protein

N1-NRR-TM(-) was expressed in Freestyle™ 293-F cells (Invitrogen, Inc., Calsbad, CA) by transient transfection using Freestyle™ Max Reagent (Invitrogen) and the manufacturer's protocol, verified by Western blot analysis. Briefly, 1×10^7 cells were seeded in a tissue culture shaker flask containing 30 milliliters (ml) of 293-F cell growth medium (Invitrogen). The secreted protein was analyzed by taking an aliquot of 0.5 ml

conditioned medium every 24 hours from day 2 to day 7 after transfection. Twenty microliters (ul) of conditioned medium and 2X protein sample loading buffer (BioRad, Hercules, CA) were combined, heated at 100°C for 5 minutes. The samples were separated through electrophoresis in a 4-12% gradient SDS-PAGE (Invitrogen). The proteins were transferred from gel to blotting membrane using a dry blotting device (Invitrogen), then the membrane was blocked in 5% non-fat dry milk in PBST (PBS with 0.05% tween-20) for one hour. Detection of N1-MRRHD-TM(-)/Fc fusion proteins was performed by incubation with human γ Fc-specific, HRP-conjugated antibody (Bethyl Lab. Inc. Montgomery, TX). The membrane was washed three times in PBST before developing with Supersignal Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL). The protein expression time course study showed that the conditioned medium of 5-6 day culture contains most secreted N1-NRR-TM(-)/Fc fusion protein. Therefore, N1-NRR-TM(-)/Fc protein expression was scaled up in 10 liters of culture volume, and the protein was purified through protein G affinity column (Invitrogen).

Establishing cell lines expressing Notch1 immunogen

N1-NRR-TM(+) was stably transfected in a mouse cell line, L-929 (ATCC, CCL-1, Manassas, VA), expressed as cell surface membrane-anchored protein. The stable cell line was established by transfection using LipoFectamineTM 2000 (Invitrogen), and the cells were selected against 1 mg/ml of neomycin (G418) for about 9-15 days until individual colonies were visible by eye and picked up for clonal growth. The expression level of N1-NRR-TM(+)/V5 protein was assessed by Western blot using protein extract made from each stable transfection clone. More specifically, cells of each clone were removed from culture vessels, rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and subjected to Western blot analysis described as above. The protein was detected by HRP-conjugated anti-V5 antibody (Invitrogen). The cell clones expressing highest level of N1-NRR-TM(+) protein was selected for the use of immunization and cell-based antibody binding assay.

Example 2: Generation of Notch1 mAb

Immunization and hybridoma cloning

Balb/c mice were immunized using human Notch1 immunogen, N1-NRR-TM(-), and a long immunization protocol. The first immunization was given via subcutaneous

(sc) injection with twenty micrograms (μg) of the antigen mixed in Complete Freund's Adjuvant (CFA) emulsion, followed by three biweekly sc injections with each delivering 20 μg of antigen mixed in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) emulsion. The serum was taken a week after fourth antigen injection to check the titer of antibodies by ELISA. The mouse with high response titer was euthanized, and the spleen was surgically removed for hybridoma cloning.

A single cell suspension of spleenocytes were prepared by forcing the spleen through a 100-micron stainless steel screen, then through a cell strainer, and wash twice in 30ml RPMI. The spleenocytes were mixed with Sp2/0-Ag14 cells (Sigma, St. Louis, MO) in three to one ratio, and cell fusion was facilitated by adding 50% PEG-1500 and gentle stirring. The mixture of cells were precipitated by centrifugation, and gently washed with RPMI, followed by incubation in RPMI-1640 medium with 20% fetal calf serum (FCS) at 37°C for 30 minutes. The cells were suspended in RPMI-1640 containing 20% FCS, standard HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine), 25% spleen-conditioned medium, 2 mM glutamate and 100ug/ml Pen-Strep, (Invitrogen; Calsbad, CA), dispensed in 96-well plates and cultured in 37°C/5%CO₂ incubator for 8 to 20 days to allow HAT-resistant hybridoma clones established. The conditioned media from each hybridoma clone were subjected to ELISA screening.

ELISA screening of monoclonal antibodies (mAb)

Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) were performed using NuncTM MaxiSorp 96-well plates (ThermoFisher Scientific, Rochester, NY), which were prepared in two sets: the positive test plates coated overnight with 100 ng of N1-NRR-TM(-)/Fc protein in each well and the negative control plates coated with 100 ng of human Fc protein. Conditioned media from hybridoma clones were screened for their ability to bind N1-NRR-TM(-)/Fc protein. One hundred microliters of each hybridoma supernatant were added to the coated plates, and incubated at room temperature for one hour. The wells were washed three times with PBST (1 X PBS with containing 0.05% Tween-20). Horse radish peroxidase (HRP) conjugated goat-anti-mouse Fc antibody was added to detect the mAbs bound to the antigen. Excessive HRP was washed off by three times of washes with PBST, 200 μl per well for each wash. ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) solution was then added as substrate for HRP color development. The reaction was stopped and plates were scanned by a plate reader at

405nm. Positive wells were re-screened with N1-NRR-TM(-)/Fc protein-coated plates and counter-screened with human Fc-coated plates in the same manner as described above. The hybridoma mAbs only binding to N1-NRR-TM(-)/Fc protein but not to human Fc were true Notch1-binding antibodies, which were selected to proceed for functional screening.

Example 3: Identification and characterization of Notch1-antagonist mAb

Establishing luciferase reporter assay cell lines

Luciferase reporter assay was commonly used to assess Notch1 receptor-mediated signaling and transcriptional activity in a variety of settings (Weng, A.P., et. al, Science, 2004, 9265-9273; Osipo et al., Oncogene, 2008, 27(37):5019-5032). For assaying ligand-induced Notch1 activation and mAb inhibition, the tool cell lines were developed to enhance Notch signaling. It was well established that the active form of Notch receptor consisting of intracellular domain translocates to the nucleus, and forms complex with CSL [named after CBF1, Su(H) and LAG-1] binding factor 1, which binds to the core sequence called CSL-binding motif in a gene promoter region, activating the downstream gene transcription (Bray, 2006). Based on those discoveries, the Notch1-mediated luciferase reporter plasmid was generated. Briefly, a concatamers of eight CSL binding motifs as described by Tun et al. (Tun et al., Nucleic Acids Res. 1994m 22(6):965-971) were inserted in the multiple cloning site of pTA-Luc (BD Biosciences, Palo Alto, CA). A hygromycin selection marker (see next paragraph) was added to the down stream of luciferase gene. This yielded the luciferase reporter plasmid, CSLuc.

The full length Notch1 expression construct was obtained from OriGene (Rockville, MD) and verified by sequencing as identical to NM_017617.2 (NCBI/GenBank accession number). A hygromycin selection marker with SV40 promoter was PCR-synthesized from pcDNA3.1/Hygromycin (Invitrogen), and connected to a growth hormone 3' poly-A signaling sequence from pcDNA5/RFT/V5-His (Invitrogen) by standard PCR joining method. The completed hygromycin marker was inserted in the Cla I site of the Notch1 expression plasmids. This plasmid is renamed as Notch1/Hyg. To enhance Notch1 activity, PEDT domain (Weng, A.P., et. al, Science, 2004, 9265-9273 et. al.) was deleted from Notch1/Hyg by site-directed mutagenesis (Genewiz, South Plainfield, NJ). The resulting plasmid was named as Notch1-dPEST. Human Jagged1 cDNA plasmid was obtained from Open Biosystems (Huntsville, AL).

Jagged1 coding region was PCR-synthesized, and inserted into pcDNA3.3-TOPO expression vector (Invitrogen).

Notch1-dependent assay cell lines were generated by cotransfecting Notch1/hyg and CSLuc plasmids into U2-OS (ATCC Number HTB-96, Manassas, VA) cells, or by cotransfecting Notch1-dPEST and CSLuc into 293T (ATCC Number CRL-11268, Manassas, VA) cells using LipoFectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Stably-transfected cells were clonally selected against 200~800 µg/ml hygromycin in DMEM growth medium (Invitrogen), the cell clones were screened by Western blot analysis as described in Example 1 and by luciferase reporter assay described in following sections. A cell line with relatively high level of Notch1 expression (based on Western blot) and Delta like-4 (Dll4)-induced luciferase activity was selected for use in functional assay. Two such example cell lines are U2-OS/Notch1-CSLuc (nick name: N1CU3) and 293/Notch1-dPEST-CSLuc (nick name: N1dP-c16). Through similar procedure, a cell line stably-expressing human Jagged1 was generated from a parental cell line, Hela (ATCC number CCL-2). The cell line was named as Hela/JAG1.

Luciferase reporter assay and identification of Notch1-antagonist hybridoma clones

For identifying Notch1-inhibitory hybridoma clones, luciferase reporter assay was performed to assess Dll4-induced Notch1 activity in N1CU3 cells. The 96-well tissue culture plates (BD Bioscience) were coated with 50 to 100 nanograms (ng) of recombinant Dll4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) per well. N1CU3 cells were seeded at 50,000 cells per well in the Dll4- or BSA-coated plates, 30 to 50 ul of conditioned media from hybridoma clones were added at same time, and cultured for 24 to 40 hours. At the end of the culture, cells were directly lysed in 1 X Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) after removing all medium, and luciferase reporter activities were assayed using Bright-Glo™ Luciferase Assay System following manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI) and MicroLumat Plus LB 96V luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Hybridoma supernatants with statistically significant inhibition to Dll4-induced Notch reporter activity were subjected to affinity purification through Protein-G column (Pierce, Rockford, IL) following manufacturer's protocol. The purified mAb were further analyzed by luciferase reporter assays again to confirm the inhibitory function to Notch1-dependent signaling.

Characterization of the anti-Notch1 mAb by luciferase reporter assays

Among the mAbs inhibiting Notch1-mediated signaling, one mAb (N248A) showed the most potent inhibitory activity, which was characterized in detail through several different luciferase reporter assays. Figure 3 shows that mAb N248A had much higher potency inhibiting Dll4 ligand-induced Notch1 signaling than that of companion mAb, mAb-C when Dll4 was coated on the surface of culture plate to induce Notch signaling. The 293/Notch1-dPEST-CSLuc cells were used in the assay. The y-axis numbers are luciferase reporter activity readings.

To assess whether mAb N248A can inhibit other Notch ligand-induced signaling, Hela/Jagged1 cells and N1dP-c16 cells were co-cultured and luciferase reporter assay as described above was performed. mAb N248A indeed completely inhibited Jagged1-induced Notch1 signaling (Figure 4).

Example 4: Determining Antibody Binding Affinity

The physical binding affinity of anti-Notch1 mAb N248A, to Notch1 antigen was measured on a surface plasmon resonance Biacore 3000 instrument equipped with a research-grade sensor chip (Chip type: CM5) using HBSP running buffer (Biacore AB, Uppsala, Sweden – now GE Healthcare) plus 1mM CaCl_2 . Protein A was amine-coupled at saturating levels onto the chip using a standard N-hydroxysuccinimide/ethyl(dimethylaminopropyl carbodiimide (NHS/EDC) chemistry. N1-NRR-TM(-)Fc protein (described in Example 1) was captured to the chip surface by Protein A in all three flow cells at 40, 13, 4 $\mu\text{g/ml}$. Anti-Notch1 mAb N248A was diluted in a 3-fold series, injected for 1 min at 100 $\mu\text{l/min}$. Dissociation was monitored for 20 minutes. The chip was regenerated after the last injection of each titration with two 30 second pulses of 100 mM phosphoric acid. Buffer cycles provided blanks for double-referencing the data, which were then fit globally to a simple binding model using Biaevaluation software v.4.1. Affinities were deduced from the quotient of the kinetic rate constants ($K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$). The data show that mAb N248A has $K_{\text{on}} = 5.19\text{e-}5$ (Ms), $K_{\text{off}} < 1.7\text{e-}4$ (1/s) and $K_D < 0.33$ nM. The tight K_D is contributed both by fast K_{on} and very slow K_{off} , which is slower than that resolvable by our assay (Refer to 5% rule, Biacore 3000 manual).

Example 5: Analysis of Notch1-antagonist mAb binding epitopes

Mapping mAb binding epitopes by domain swap with human Notch2

For understanding the mechanism of action by Notch1-antagonist mAb, binding epitopes of Notch1-antagonist mAbs were analyzed by domain swap and ELISA binding assay. The Notch1-NRR-TM(-)/Fc protein was divided into six domains: EGF (including EGF35-36), Lin12-A (or Lin-A), Lin-B, Lin-C, heterodimerization domain-N (or HD-N) and HD-C (Figure 5). Each of the domains were swapped for that corresponding to human Notch2 by PCR synthesis in a series of chimeric Notch1-NRR-TM(-)/Fc expression constructs. The domain-swap plasmids were transfected in Freestyle™ 293-F cells (Invitrogen, Inc., Calsbad, CA) using Freestyle™ Max Reagent (Invitrogen) as described above in Example 1. After being cultured for three days, the conditioned media was subjected to Western blot analysis and an ELISA binding assay by Notch1 mAbs. Western blot (method as in Example 1) showed that five of the six domain-swap constructs expressed well except that Lin-B/Notch2 swap was poorly expressed.

In ELISA assay, the 100 microliters of the conditioned medium from the above antigen plasmids-transfected cell culture were loaded in each well of the 96-well plate, and plates were incubated at room temperature for 4 hours or 4°C for overnight. The condition medium was then removed from the coated plates. For primary antibody binding, 300ng of each mAb (Table 3) in 100 microliters of PBS was added to the coated well. The rest of the ELISA procedure is the same as described in Example 2. The mAb N99a, N326A and N440A were monoclonal antibodies that bind to Notch-1, generated and isolated by the same procedures of that of mAb N248A. As shown in Table 3, binding of mAb N248A to the chimeric antigens was completely abolished when Lin-A or HD-C domain was swapped to corresponding Notch2 domain. On the other hand, swapping of EGF, Lin-C or HD-C domain did not affect its binding. The mAbs N326A and N440A were distinctly different from mAb N248A. These two mAbs require HD-N and HD-C domains for their binding activity. N99A is somewhat similar to mAb N248A in that its binding requires Lin-A and HD-C domains. However, swap of the HD-N domain also reduced N99A binding activity. These data supported the conclusion that mAb N248A has at least two distinguishable sets of binding epitopes, one in Lin-A domain and the other in HD-C domain. Whether there is another epitope in Lin-B domain was resolved in a separate experiment. Similarly, all the other three Notch1-

antagonist mAbs have two identifiable sets of binding epitopes, one in the HD-C domain and the other in the domains of Notch1 N-terminal subunit. Based on the recently published crystal structures of Notch1 (Gordon, WR et al., Blood, 2009, Volume 113, 4381-4390) and Notch2 (Gordon et al., Nature Structure Molecular Biology, 2007, Volume 14, 295-300) NRR regions, the three Lin12 domains are wrapped around the HD domains, blocking random cleavage and activation by ADAM protease, and therefore maintaining the receptor in non-active or silent status. The mAb N248A binds to Notch1 at two distinct sets of epitopes, causing the Notch1 to be locked down in the silent conformation, and thus preventing the receptor from being activated by its ligands.

Notch1 gene mutations, mostly point mutations and some small deletions and insertions, have been reported in more than 50% of T-ALL (Weng, A.P., et. al, Science, 2004, 9265-9273; Malecki et al., Molecular Cell Biology, 2006, 26(12):4642-4651). The mutations are clustered in two regions: one in the C-terminus of the intracellular moiety and the other in the HD-N domain. These findings support the notion that mAb N248A would have better therapeutic utility in T-ALL than the other three mAbs listed in Table 3 because the HD-N domain swap did not affect the binding of mAb N248A to Notch1 while the binding of the other three was affected (see Table 3).

Table 3. ELISA reading of Notch1 mAb binding to chimeric antigens

mAbs →		N248A	N99A	N326A	N440A
Notch1 chimeric antigen swapped with corresponding Notch2 domain	EGF	3.51	3.20	3.48	2.85
	Lin-A	0.05	0.04	3.47	3.28
	Lin-B	n/a	n/a	n/a	n/a
	Lin-C	3.48	3.17	3.50	2.83
	HD-N	3.52	1.25	0.10	0.12
	HD-C	0.04	0.04	0.05	0.07

N248A binds to human Notch1, but not mouse Notch1

To locate the binding epitopes of N248A1, we generated murine Notch1-NRRHD expression plasmids containing mouse Notch1 cDNA coding region from nucleotide 1-99 and nucleotide 4327 to 5169 (NCBI Accession #, NM_008714), and performed transient transfection and ELISA binding assay (methods described in previous sections, Example 1 and 5). The results showed that N248A1 does not bind to mouse Notch1, and only binds to human Notch1 (Table 4). We further made domain-swap chimeric Notch1-NRRHD expression constructs using the human Notch1-NRRHD sequence (Nucleotide 1-129 and 4338-5202, NCBI Accession # NM_017617) as frame work, systematically exchanged the human Lin-A, Lin-B or HD-C domains with the corresponding mouse domains. An ELISA binding assay using this human/mouse domain swap protein as bait demonstrated that the binding of N248A1 to human Notch1 antigen is abolished when the Lin-A domain is exchanged to mouse sequence while the Lin-B or HD-C domain exchange did not affect the binding. In contrast, the other control mAb, 22F7, loses binding only when Lin-B is exchanged to the mouse sequence. Therefore, the binding epitope that determines whether N248A1 only binds to human Notch1, not to mouse, is located in the Lin-A domain.

Table 4. ELISA readings of Notch1 mAb binding to human, mouse and chimeric antigens

Antigens		N248A	22F7
huN1-NRRHD		3.13	3.19
MuN1-NRRHD		0.17	0.09
Notch1 chimeric antigen indicated domain swapped with murine sequence	Mu/Lin-A	0.33	3.27
	Mu/Lin-B	3.37	0.38
	Mu/HD-C	3.17	3.19

Identify binding epitope of N248A1 in Lin-A domain

To identify binding epitope of N248A1 in the Lin-A domain, we mutated the two amino acids which are different between the human and mouse Lin-A domains, i.e.

1457E/A and 1465S/N, (Table 5). ELISA results showed that mutation 1457E/A did not affect the binding, but mutation 1465S/N abolished the binding, indicating that amino acid Asn (N) in mouse Lin-A is the sole amino acid residue responsible for blocking N248A1 binding to mouse Notch1. Several amino acids surrounding 1465S were mutated to alanine sequentially (Table 5). Mutation of 1463V/A, 1466L/A or 1467Q/A also abolished the N248A1 binding. However, the control mAb A2 was not affected by the mutations 1463V/A or 1465S/N (Table 5). These experiments demonstrated that the binding epitope of N248A1 in Lin-A involves 1463V, 1465S, 1466L and 1467Q.

Table 5. Analysis of N248A1 point mutation and ELISA binding activity

Antigens	Sequence of Lin-A	Binding activity	
		N248A1	A2
huN1-NRRHD	ACELPECQ <u>E</u> DAGNKVC <u>S</u> LQCHNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	100%	100%
mu/Lin-A	ACELPECQ <u>V</u> DAGNKVC <u>N</u> LQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	11%	151%
Mutant 1457E/A	ACELPECQ <u>A</u> DAGNKVCSLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	112%	110%
Mutant 1462K/A	ACELPECQ <u>E</u> DAGN <u>A</u> VCSLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	85%	88%
Mutant 1463V/A	ACELPECQ <u>E</u> DAGNK <u>A</u> CSLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	6%	56%
Mutant 1465S/N	ACELPECQ <u>E</u> DAGNKVC <u>N</u> LQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	8%	109%
Mutant 1466L/A	ACELPECQ <u>E</u> DAGNKVC <u>S</u> AQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	1%	4%
Mutant 1467Q/A	ACELPECQ <u>E</u> DAGNKVC <u>S</u> LQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	4%	16%

Identify binding epitope of N248A1 in HD-C domain

A serial of five sub-domain swap chimeric antigens (Table 6) were generated by sequentially swapping clusters of amino acids from Notch1 sequence to Notch2 sequence. ELISA results showed that the sub-domain swap-1 significantly reduced N248A1 binding while the other four subdomain swap antigens does not affect N248A1 binding. On the other hand, the parallel control mAb 19H7 showed significant binding affinity reduction on sub-domain swap 1, 3 and 5 (Table 6). All the subdomain swap antigen expression and secretion in conditioned media was confirmed by Western blot

analysis (Methods in above). All subdomain swap antigens except subdomain swap 5 have equal or higher expression than human Notch1-NRRHD (huN1-NRRHD) protein. The subdomain swap 5 expressed at about 50% level of huN1-NRRHD based on Western blot band intensity comparison (data not shown). These experiments showed that the binding epitope of N248A1 in HD-C includes five amino acids, 1705G, 1706A, 1707L, 1709S and 1710L (human Notch1 coding cDNA sequence, NCBI accession # NM_017617), as highlighted in Table 6.

Table 6. ELISA readings of Notch1 mAbs binding to human Notch1-NRRHD and chimeric antigens with subdomain swapped to Notch2 sequences

Antigens	Sequence of HD-C	Binding activity	
		N248A1	19H7
huN1-NRRHD	FLGALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQKRR	3.05	2.92
Subdomain swap 1	FLASHAIQG	0.48	0.48
Subdomain swap 2	GTLNISYPI	2.76	2.51
Subdomain swap 3	KLVSVVSE	2.81	0.2
Subdomain swap 4	ESLETTPP	2.89	2.62
Subdomain swap 5	PERTQKSR	1.48	0.62

Example 6: Notch1 mAb inhibits cancer cell growth in cell culture

Inhibition of HPB-ALL leukemia cells growth and reduction of NICD by mAb N248A

The T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell line, HPB-ALL, was derived from a childhood T-ALL (Morikawa et al., Int J. Cancer, 1978, 21(2):166-70), and obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany). This cell line harbors a Notch1 mutation that leads to high level of Notch1 intracellular domain (NICD), the active form of Notch1, as a result of enhanced gamma secretase cleavage. For growth inhibition assays, HPB-ALL cells were seeded in 96-well plates at 10,000 cell/well in RPMI1640 media supplemented with 10% FBS (Invitrogen). Serially diluted mAb N248A or D16A was added at beginning, and cells were cultured at 37°C for 7 day. At the end of the

culture, phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1 mg/ml of Resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added to the cells, and the plates were incubated at 37°C for 4 hours. Fluorescent signals were read through dual filters with excitation = 560 nm and emission = 590 nm. IC₅₀ values were calculated using the sigmoidal dose-response (variable slope) in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

For in vitro NICD analysis, HPB-ALL cells were seeded in 6-well plates at 2×10^6 cells per well and cultured in RPMI1640 with 10% FCS (Invitrogen). mAb N248A or control antibody D16A was added to the culture at variable concentrations as indicated in Figure 6. Cells were cultured in the presence of antibodies at 37°C for 24 hours. They were then collected and lysed in cold 1X Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technologies, Boston MA). Proteins were extracted from cell lysate by centrifuging at 13,000 rpm for 10 minute at 4°C. Protein concentrations were determined using a BCA assay (Pierce, Rockford, IL). The level of NICD in each sample was determined by western blot analysis.

In each western blot analysis, about 50 µg of lysate was resolved by electrophoresis through a polyacrylamide gel (BioRad Laboratories, Hercules, CA), and transferred to nitrocellulose membrane, which was subjected to immunoblot analysis using rabbit anti-NICD antibody (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) and mouse α actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). IRDye 680 or 800 conjugated secondary antibodies (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) were used to visualize the Western blot bands. The images were analyzed using Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

The results demonstrated that inhibition of HPB-ALL cell growth by mAb N248A is correlated to the reduction of NICD levels. At 24 hours of treatment, mAb N248A reduced NICD levels in a dose dependent manner, the highest reduction was observed at 30 µg/mL. After 7 days of treatment, mAb N248A caused significant inhibition of cell growth. IC₅₀ value for the cell growth inhibition is approximately 0.78 µg/ml or ~5.2 nM.

Inhibition of breast cancer cell growth

It was well documented that expression of Notch1 was aberrantly increased in breast cancer (Reedijk et al. Cancer Research, 2005, 65(18):8530-8537; Klinakis et al., 2006; Efstratiadis et al., Cell Cycle, 2007, 6(4):418-429) which was associated to poor

survival rate (Reedijk et al. Cancer Research, 2005, 65(18):8530-8537). In transgenic mice expressing the activated form of Notch1 in mammary tissue, almost all the mice developed breast cancer by one year (Hu et al., American Journal of Pathology, 2006, 168(3):973-990). To test the hypothesis that blocking Notch1-mediated signaling would

5 inhibits breast cancer cell growth, several breast cancer cell lines were cultured in presence of 10 μ g/ml mAb N248A antibody, Herceptin (Genentech/Roche, South San Francisco, CA) or control mouse immunoglobulin G (mIgG). All the cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) with 1% FCS for two to three days. The viable cells was quantified by Cell Titer GlowTM (Promega), and scanned by MicroLumat Plus LB 96V

10 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). To the same panel of breast cancer cells, expression of Notch1 and Jagged1 on cell surface was analyzed by FACS. The results demonstrated that the growth inhibition of the breast cancer cells by mAb N248A is roughly correlated to Notch1 and Jagged1 expression level. mAb N248A exerts the strongest inhibition to MDA-MB-231 cells, which expresses relatively high

15 level of Notch1 and Jagged1. Interestingly, BT475 cell-derived, Heceptin-resistant cell line, BT475HR, showed increased expression of Notch1 and Jagged1 comparing to parental BT475 cell line. mAb N248A inhibited BT475HR cell growth, while Heceptin did not. The data indicated potential utility of mAb N248A in therapeutic treatment of breast cancer which has increased expression of Notch1 or resistant to current drug, Heceptin.

20 Table 7. Tumor cell growth inhibition assay of anti-Notch1 mAb, N248A. Expression index represents fold increase of FACS geometric mean after the breast cancer cells were immuno-stained with anti-Notch1 or anti-Jagged1 antibody. Relative cell proliferation index stands for percentage of control cell cultured in parallel without adding any agent. BT-474HR is Herceptin-resistant cell line derived from BT-474

25 (ATCC).

Table 7

Cell Lines	Expression index		Relative cell proliferation index		
	Notch1	Jagged1	N248A	Herceptin	mIgG
MDA-MB-231	1.7	4.4	69	96	103
BT-474HR	2.5	3.0	80	97	99
HCC38	1.5	1.8	86	97	99
HCC1954	1.5	1.8	88	94	99

SKBR3	1.6	1.2	97	84	107
BT-474	1.4	1.0	98	68	98
MCF7	1.2	1.1	98	101	95
BT549	1.1	1.1	115	103	112

To confirm that the growth inhibition of breast cancer cell by N248A is mediated by block Notch signaling, the expression of two well-known Notch down-stream target genes was assessed by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (QRT-PCR). MDA-MB-231 cells were cultured in presence of N248A or control mAb for two days, and then harvested to isolate total RNA using RNAeasy reagent kit and protocol (Qiagen). The results demonstrated that mAb N248A indeed blocked HES1 and HES4 expression (Figure 7), confirming the mechanism of action by N248A.

Example 7: Notch1 mAb inhibits T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) in murine xenograft tumor model

T-ALL tumor growth inhibition by Notch1 mAb

For establishing mouse model T-ALL xenograft model, immune-compromised athymic female Nude (Nu/Nu) mice (average at 20 grams, 6-8 weeks old), were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, MA) and housed in specific pathogen-free conditions following the guidelines of the Association for the Assessment and Accreditation for Laboratory Animal Care, International. Animals were provided sterile rodent chow and water *ad libitum*. All *in vivo* studies were carried out under approved institutional experimental animal care and use protocols.

HPB-ALL Cells were harvested from fresh culture before implanting in host mice, and washed once and re-suspended in sterile, serum-free medium. The cell suspension was adjusted appropriate density and supplemented with 50% Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) to facilitate tumor take. A total of $5-10 \times 10^6$ cells in 200 μ L were implanted subcutaneously into the hind-flank region of the mouse and allowed to grow to the designated size prior to the administration of antibody for each experiment.

For anti-tumor efficacy study, animals bearing HPB-All tumors of 150-300 mm³ in size were randomized and divided into four groups receiving N248A at 1 mg, 3 mg and 10 mg per kilogram (kg) respectively, or receiving control antibody D16A at 5 mg per kg. The mAbs were injected subcutaneously once a week for 2 weeks. Animal body weight and tumor measurements were obtained every 2-3 days. Tumor volume (mm³) was

measured with Vernier calipers and calculated using the formula: length (mm) x width (mm) x width (mm) x 0.4. The tumor volumes of drug-treated and vehicle-treated mice on the final day of study were used to calculate percent (5) inhibition values as $100 - \{1 - [(Treated_{Final\ day} - Treated_{Day\ 1}) / (Control_{Final\ day} - Control_{Day\ 1})]\}$. For all tumor growth inhibition (TGI) experiments, 8 to 10 mice per dose group were used. A Student's *t* test was used to determine the *P*.

As shown in Figure 8, Notch1 mAb, N248A, demonstrated robust antitumor activity in this model after 11 days' treatment, i.e. two weekly doses. The average tumor growth inhibition (TGI) in the 10 mg/kg group versus control mAb group is more than 77 %, which is highly significant in statistical term ($P < 0.01$). TGI was roughly dose-dependent with an exception that the two lower dose groups, 1 mg/kg and 3 mg/kg, are too close to differentiate. The exact causes for this observation are unclear though it is likely due to high variability in tumor size of this model. N248A, as a human Notch1-specific inhibitor, was well-tolerated in mice, without causing significant weight loss, morbidity or mortality in any treatment groups.

Pharmacokinetics and pharmacodynamics (PK/PD) of Notch1 mAb in mice

For PK/PD study, mice bearing tumors with size ranging 300-800 mm³ were administered a single dose of N248A at 5 mg/kg by subcutaneous injection. After administration of N248A mice were euthanized at time points of 6, 16 hours, and 1, 2, 3, 5 days. Blood samples were drawn from the left cardiac ventricle using a syringe and transferred to tubes primed with heparin sulfate. In the meantime, the tumors were taken out by resection, snap-frozen and homogenized in cold 1X Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technologies, Boston MT). Proteins were extracted from the tumor lysate and the level of NICD in each tumor sample was determined using western blot analysis described above. The blood samples were subject to centrifugation to separate serum from blood cells. The serum level of N248A was assessed by ELISA method as described in Example 2. The ELISA plate was first coated with human Fc-specific mAb, which captures Notch1-NRR-TM(-)/Fc antigen. The Notch1 antigen in turn binds to Notch1 mAb, N248A, in sera.

The PK curve indicated that N248A mAb reached maximum concentration (~235 nM) in mouse sera 24 hours after injection. The estimated half life is about 4.5 days (Figure 9). Evaluation of the direct marker for Notch1 activation (i.e. NICD) showed that

the tumor samples harvested from mice treated with N248A had a robust NICD reduction, which persisted until five days post dosing (Figure 10). In contrast, the control mAb, D16A, did not reduce NICD level (data not shown). The maximal inhibition of NICD by N248A at 5 mg/kg was approximately 80%.

5

Example 8: Cloning and sequences of Notch1 mAb, N248A

The sequences of the variable regions of mAb N248A was determined. The antibody IgG subtype was first assessed using an IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). The results indicated that N248A has an IgG₁ heavy chain and a lambda light chain. For cloning and sequencing of mAb N248A, 1 x 10⁶ hybridoma cells were harvested and lysed to isolate total cellular RNA using RNeasy Mini Reagent kit and manufacturer's protocol (Qiagen, Valencia, CA). The first strand cDNA was synthesized on the RNA templates using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The cDNAs of the variable regions of light chain and heavy chain were amplified by PCR from the first strand cDNA using degenerate forward primers complimentary to the 5'-end of mouse lambda chain coding sequence and a reverse primer matching the constant region adjacent to the 3'-end of the variable region, or using degenerate forward primers complementary to the 5'-end of mouse IgG1 heavy chain coding sequence and a respective IgG1 constant region reverse primer. PCR cycling conditions were as follows: 1 cycle at 96 °C for 1 minute, followed by 40 cycles at 95 °C for 20 sec, 50 °C for 20 sec, and 72 °C for 30 second. The resulting PCR products were cloned into pCR-4-TOPO vector (Invitrogen), sequenced by conventional methods, and analyzed using Vector NTI Advance software, (Invitrogen). The cloned antibody sequences were confirmed by direct comparison with the N-terminal sequences obtained from purified hybridoma-derived antibody, as determined by Mass spectrometry (Univ. of CA, Davis, Molecular Structure Facility). The compiled sequence results demonstrated that the variable region of mAb N248A heavy chain contains 121 amino acid residues, and the light chain contains 109 amino acid residues. Further analysis of the N248A mAb V_H sequence and V_L sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 and light chain CDR1, CDR2 and CDR3. The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region CDR1, CDR2 and CDR3 of mAb N248A are shown in Figure 15 as sequences 15-20 (SEQ ID NO: 15-20). The

nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region CDR1, CDR2 and CDR3 of mAb N248A are shown in Figure 14 as sequences 9-14 (SEQ ID NO: 9-14). The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region and light chain variable region of mAb N248A are shown in Figure 13 as sequences 5-8
5 (SEQ ID NO: 5-8).

Claims

What is claimed is:

1. An isolated antibody, or an antigen binding portion thereof, that specifically binds
5 to human Notch-1, wherein the antibody or antigen binding portion binds to at least a first epitope and a second epitope, wherein the first epitope resides within the Lin-A domain of human Notch-1, and the second epitope resides within the HD-C domain of human Notch-1.
2. The antibody or the antigen binding portion of claim 1, wherein the antibody or
10 the antigen binding portion binds to both the first epitope and the second epitope, and that the first epitope and the second epitope are the only major epitopes that the antibody or the antigen binding portion binds to.
3. The antibody or the antigen binding portion of claim 2, wherein the first epitope is
15 a major epitope comprising 1 to 4 amino acid residues selected from 1463V, 1465S, 1466L and 1467Q.
4. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 1, 2 and 3, wherein the second epitope is a major epitope comprising of 1 to 5 amino acid residues selected from 1705G, 1706A, 1707L, 1709S and 1710L.
5. The antibody or the antigen binding portion of claim 3 or claim 4, wherein a non
20 conservative substitution of any of the amino acid residues of the first epitope results in a loss of more than 80% of the antibody or the antigen binding portion's binding affinity to human Notch-1.
6. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 1 to 5, wherein the antibody or the antigen binding portion is humanized, human, or chimeric.
- 25 7. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 1-5, wherein the antibody or the antigen binding portion is a mouse antibody.
8. The antibody or the antigen binding portion of claim 6, wherein said antibody or the antigen binding portion binds to human Notch-1 with a K_D of 1×10^{-4} M or less.
9. An isolated monoclonal antibody, or an antigen binding portion thereof, that
30 specifically binds to human Notch-1, comprising

(i) a heavy chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:18, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO: 18 are modified;

5 (ii) a heavy chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:19, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO: 19 are modified; and

(iii) a heavy chain variable region CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:20, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO: 20 are modified.

10 10. The antibody or antigen binding portion of claim 9, wherein any of the modifications of heavy chain variable region CDR1, CDR2 and CDR3 is a conservative substitution of the amino acid residue thereof.

11. The antibody or the antigen binding portion of claim 9, wherein none of the heavy chain variable region CDR1, CDR2 and CDR3 is modified.

15 12. An isolated monoclonal antibody, or an antigen binding portion thereof, that specifically binds to human Notch-1, comprising

(i) a light chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:12, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:12 are modified;

20 (ii) a light chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:13, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO:13 are modified; and

25 (iii) a light chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:14, or a variant thereof in which 1-4 residues of SEQ ID NO: 14 are modified.

13. The antibody or the antigen binding portion of claim 12, wherein any of the modification of the light chain variable region CDR1, CDR2 and CDR3 is a conservative substitution of the amino acid residues thereof.

30 14. The antibody or the antigen binding portion of claim 12, wherein none of the light chain variable region CDR1, CDR2 and CDR3 is modified.

15. An isolated antibody, or an antigen binding portion thereof, that specifically binds to human Notch-1, comprising:

(i) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 18,

(ii) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 19,

5 (iii) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 20,

(iv) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 12,

(v) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 13, and

(vi) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 14,

10 wherein 1-4 amino residues of each of the light chain CDR and the heavy chain CDR may be modified.

16. The antibody or the antigen binding portion of claim 15, wherein any of the modification of the light chain CDRs and the heavy chain CDRs is a conservative substitution of the amino acid residues thereof.

15 17. The antibody or the antigen binding portion of claim 15, wherein none of the light chain CDRs and the heavy chain CDRs is modified.

18. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 8 to 17, wherein the antibody or the antigen binding portion is a mouse antibody or the antigen binding portion of a mouse antibody.

20 19. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 8-17, wherein the antibody or the antigen binding portion is humanized, human, or chimeric.

20. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 8 to 17, wherein the antibody or the antigen binding portion binds to human Notch-1 with an equilibrium dissociation constant K_D of less than $1 \times 10^{-5}M$.

25 21. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 8 to 17, wherein the antibody or the antigen binding portion binds to human Notch-1 with an equilibrium dissociation constant K_D of less than $2 \times 10^{-6}M$.

22. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 8 to 17, wherein the antibody or the antigen binding portion binds to human Notch-1 with an equilibrium dissociation constant K_D of less than $1 \times 10^{-6}M$.

23. The antibody or the antigen binding portion of any of claims 8 to 17, wherein the antibody or the antigen binding portion binds to human Notch-1 with an equilibrium dissociation constant K_D of less than $2 \times 10^{-6}M$.

24. The antibody of any of claims 8-17, which is a human full length antibody of subclass IgG₁, IgG₂, IgG₃ or IgG₄.

25. The antibody of any of claims 8-17, wherein the antibody is a humanized antibody of subclass IgG₁, IgG₂, IgG₃ or IgG₄.

26. The antibody of any of claims 8-17, wherein the antibody is a chimeric antibody of subclass IgG₁, IgG₂, IgG₃ or IgG₄.

27. A pharmaceutical composition comprising the antibody or the antigen binding portion of any of claims 1-26.

28. A cell line that recombinantly produces the antibody or the antigen binding portion of any of claims 1-26.

29. An oligonucleotide encoding either the heavy chain or the light chain of the antibody or the antigen binding portion of any of claims 1-26.

30. A method for treating cancer comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the antibody or the antigen binding portion of any of claims 1-26, or a pharmaceutical composition thereof.

31. An antibody or the antigen binding portion thereof of any of claims 1-26, or pharmaceutical composition thereof, for the use in the treatment of cancer.

FIG. 1

PCR synthesis of N1-NRR-TM(-) cDNA

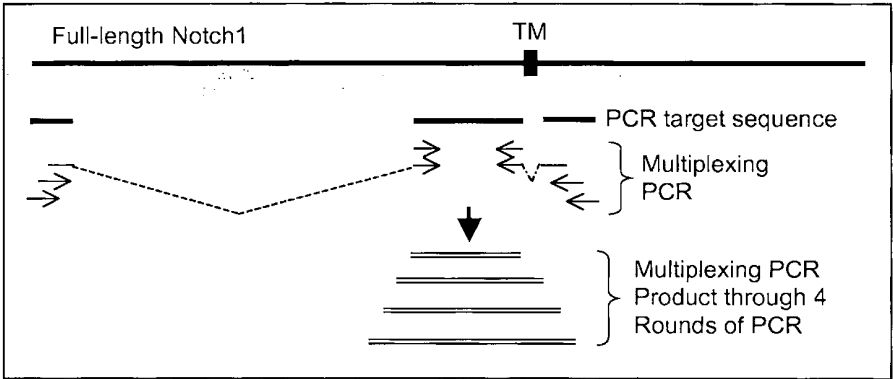
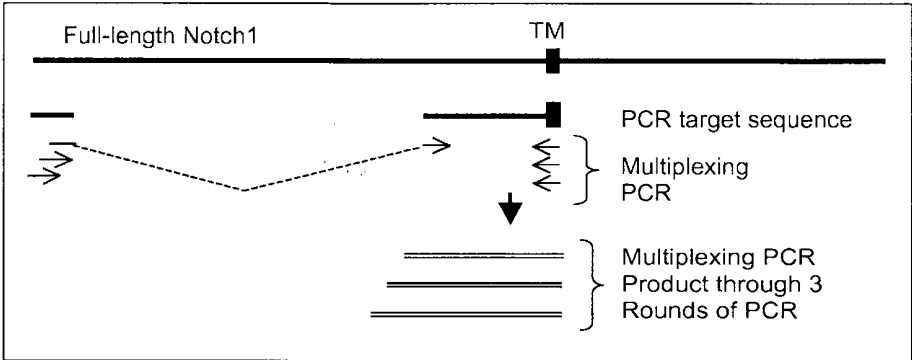


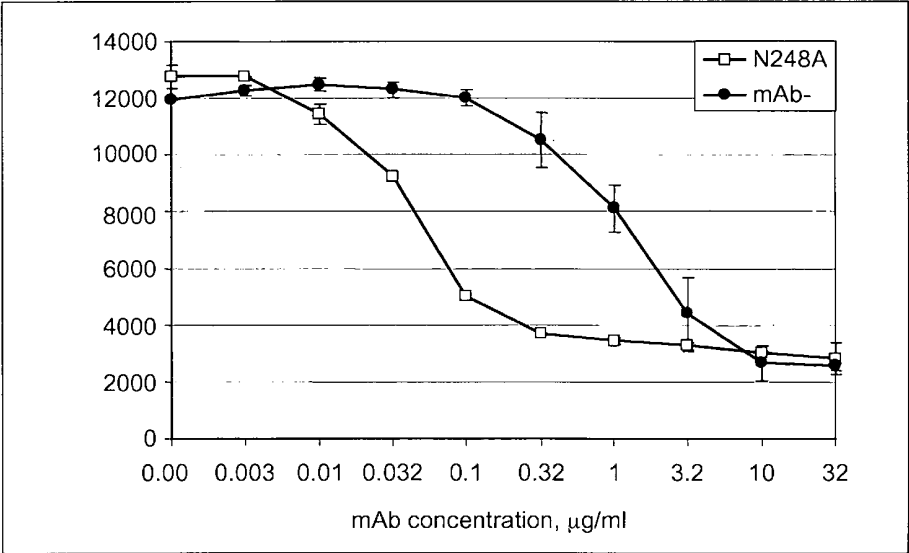
FIG. 2

PCR synthesis of N1-NRR-TM(+) cDNA



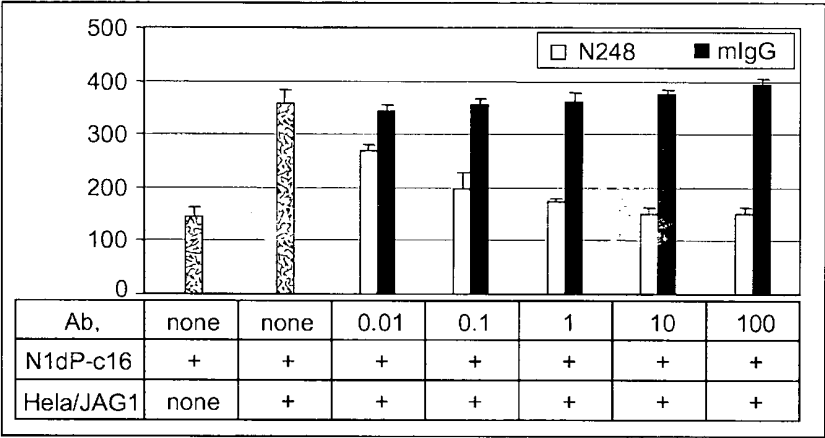
Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

FIG. 3



Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

FIG. 4



4/10

FIG. 6A

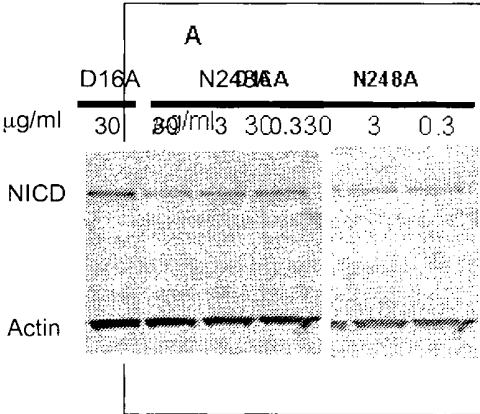


FIG. 6B

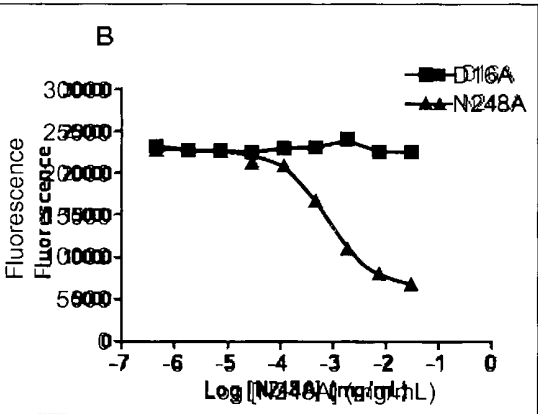


FIG. 7A

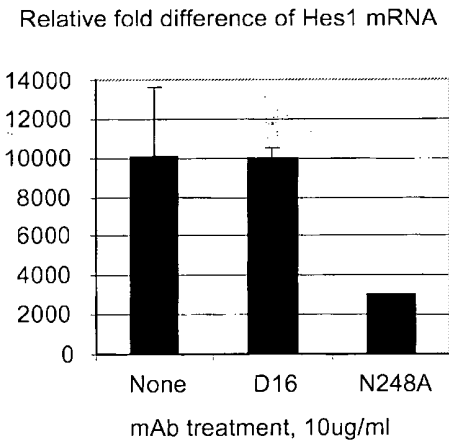
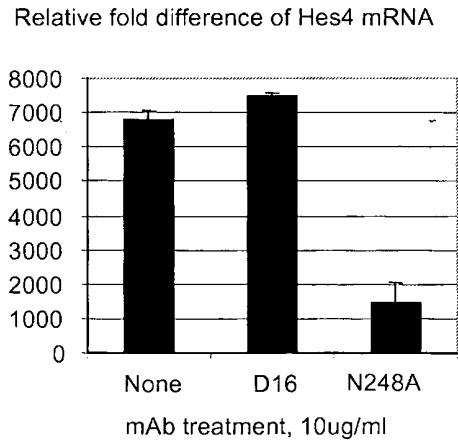
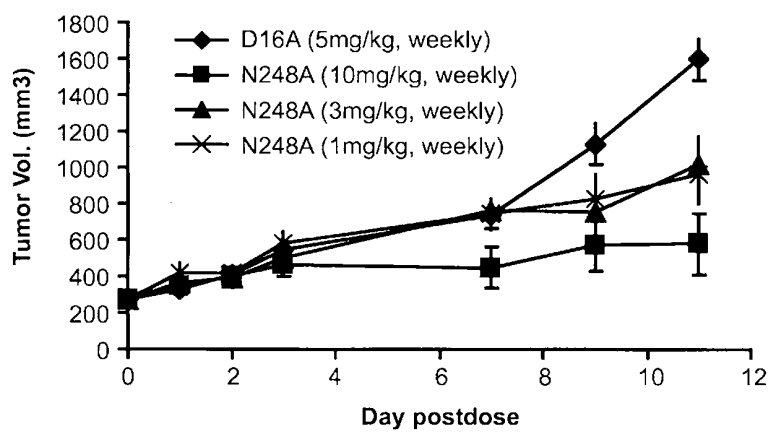


FIG. 7B



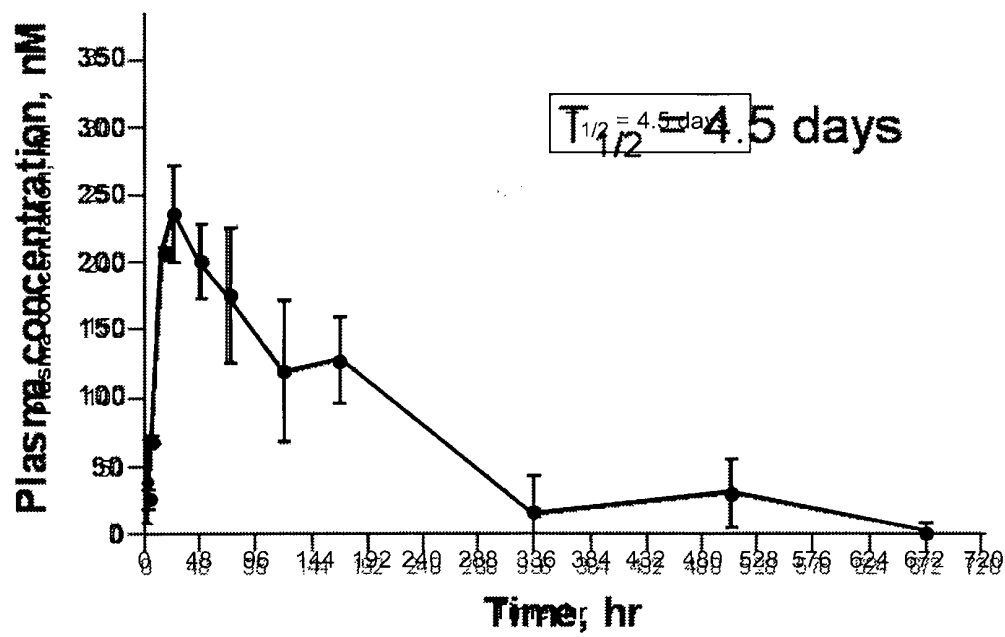
Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

FIG. 8



Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

FIG. 9

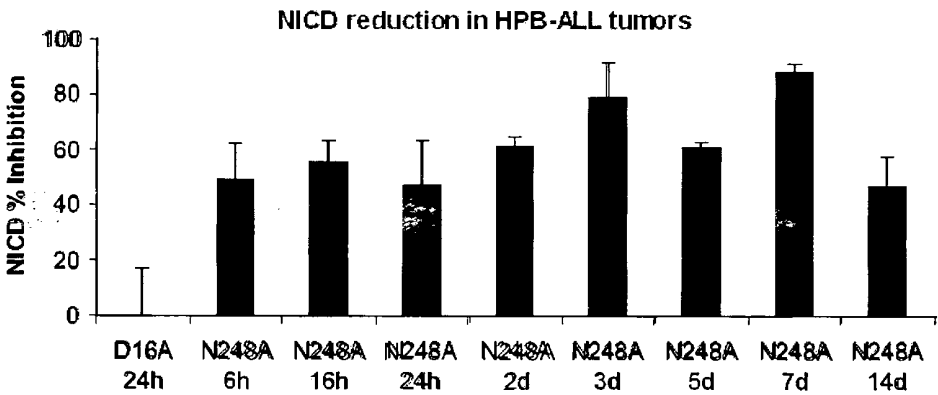


Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

WO 2010/146550

FIG. 10

NICD reduction in HPB-ALL tumors



10/10

PCT/IB2010/052711

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2010/052711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/32
ADD.

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)

C07K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI KANG ET AL: "Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 12, March 2008 (2008-03), pages 8046-8054, XP002599615 ISSN: 0021-9258	1-6, 9-17, 30, 31
Y	figures 1-8 page 8046, line 12 - line 22, last paragraph page 8053, line 33 - page 8054, line 11 ----- -/--	7, 8, 18-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* 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 document 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 2010

Date of mailing of the international search report

19/10/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fellows, Edward

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2010/052711

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIPRIYANOV S M ET AL: "Generation and production of engineered antibodies" MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US LNKD- DOI:10.1385/MB:26:1:39, vol. 26, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 39-60, XP009044299 ISSN: 1073-6085 the whole document	7,8, 18-29

ANTICUERPOS ANTI NOTCH-1

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 61/218.193, presentada el 18 de junio de 2009, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad como referencia.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que antagonizan la actividad de Notch-1, al método de producción de dichos anticuerpos, al método de análisis de dichos anticuerpos y al método de uso de dichos anticuerpos para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

Las proteínas Notch son proteínas receptoras de la membrana. Existen cuatro receptores Notch en los mamíferos. Durante la maduración del receptor, los ectodominios de los receptores Notch de los mamíferos se escinden en un sitio S₁ mediante una proteasa tipo furina, lo que produce una subunidad extracelular y una subunidad transmembranal que se mantienen juntas por un dominio de heterodimerización (HD). La parte del dominio HD asociada a la subunidad extracelular se denomina HD-N, y la otra parte de HD, la porción extracelular de la subunidad transmembranal, se denomina HD-C. La subunidad extracelular contiene una región de repetición tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) grande y tres repeticiones Lin12. La unión al ligando de las regiones de repetición de EGF induce la escisión proteolítica mediante la metaloproteasa tipo ADAM en el sitio S₂ del dominio HD-C, lo cual desencadena la escisión posterior mediante la secretasa y en el sitio S₃ y libera la parte intracelular de Notch de la membrana; esto permite que se desplace hacia el interior del núcleo y regule la transcripción génica. (Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300).

Antes de la activación inducida por el ligando, el Notch se mantiene en una confirmación resistente a la metaloproteasa en reposo mediante una región de regulación negativa (NRR) conservada que consiste en las tres repeticiones Lin12 y el dominio HD. (Vardar et al., Biochemistry 2003, 41: 7061-7067; Sanchez-Irizarry et al., Mol. Cell. Biol. 2004, 24: 9265-9273; Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300). En ocasiones, la NRR de las proteínas Notch también se define como que solo consiste en las repeticiones Lin12 y el dominio HD del terminal N (HD-N) después de la escisión proteolítica en el sitio S₁. (Weng, A.P., et.

al, Science, 2004, 9265-9273.) El dominio NRR previene la proteólisis independiente del ligando de la vía de Notch.

Las vías de Notch funcionan durante diversos procesos fisiológicos y de desarrollo, incluso los que afectan la neurogénesis en moscas y vertebrados. En general, la señalización de Notch participa en la inhibición lateral, en las decisiones de linaje y en el establecimiento de límites entre los grupos celulares. (Bray, S.J., Nature Reviews, 2006, 678-688).

Sin embargo, las actividades de Notch también están asociadas a varias enfermedades de los seres humanos, incluido el cáncer. Por ejemplo, las mutaciones de Notch1 se detectaron en más del 50 % de los casos de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T. (Radtke, F, Nature Review, Cancer, 2003, 756-767). Existe la necesidad de identificar agentes terapéuticos que regulen la vía de señalización de Notch-1 para usar en el tratamiento del cáncer.

Síntesis

En una forma de realización, esta invención proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno de este, que se une a Notch-1, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se unen, al menos, a un primer epítipo y un segundo epítipo, en donde el primer epítipo reside en el dominio Lin-A de Notch-1, y el segundo epítipo reside en el dominio HD-C de Notch-1. Preferentemente, el Notch-1 es Notch-1 humano.

En un aspecto de esta forma de realización, el primer epítipo es un epítipo principal. Preferentemente, una sustitución no conservadora de cualquiera de los residuos de aminoácidos del primer epítipo da como resultado la pérdida de más del 60 %, con mayor preferencia, más del 80 %, aun con mayor preferencia, más del 90 % de la afinidad de unión del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno con el Notch1 humano.

En otro aspecto, el segundo epítipo es un epítipo principal. Preferentemente, una sustitución no conservadora de cualquiera de los residuos de aminoácidos del segundo epítipo da como resultado la pérdida de más del 60 %, con mayor preferencia, más del 80 %, aun con mayor preferencia, más del 90 % de la afinidad de unión del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno con el Notch-1 humano.

En otro aspecto, tanto el primer como el segundo epítipo son epítopos principales. Preferentemente, una sustitución no conservadora de cualquiera de los residuos de aminoácidos del primer y segundo epítipo da como resultado una pérdida de más del 60 %, con mayor preferencia, más del 80 %, aun con mayor preferencia,

más del 90 % de la afinidad de unión del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno con el Notch-1 humano.

En otro aspecto de esta forma de realización, Notch-1 es Notch-1 humano. En otro aspecto de esta forma de realización, Notch-1 es Notch-1 de ratón.

En otro aspecto de esta forma de realización, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se unen a 1-4 epítomos adicionales, en donde cada uno de dichos epítomos adicionales reside en el dominio Lin-A o en el dominio HD-C del Notch-1 humano.

En otro aspecto de esta forma de realización, los únicos epítomos principales a los que se unen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son el primer y el segundo epítomo. Más específicamente, el primer epítomo es un epítomo principal que comprende de 1 a 4 residuos de aminoácidos seleccionados de 1463V, 1465S, 1466L y 1467Q del dominio LinA del Notch-1 humano. Preferentemente, el primer epítomo es un epítomo principal que consiste en los 4 residuos de aminoácidos seleccionados de 1463V, 1465S, 1466L y 1467Q del dominio LinA del Notch-1 humano. Asimismo, más específicamente, el segundo epítomo es un epítomo principal que comprende de 1 a 5 residuos de aminoácidos seleccionados de 1705G, 1706A, 1707L, 1709S y 1710L del dominio HD-C del Notch-1 humano. Preferentemente, el segundo epítomo es un epítomo principal que consiste en 1 a 5 residuos de aminoácidos seleccionados de 1705G, 1706A, 1707L, 1709S y 1710L del dominio HD-C del Notch-1 humano. Aun más específicamente, una sustitución no conservadora de cualquiera de los residuos de aminoácidos del primer o segundo epítomo da como resultado una pérdida de más del 70%, más del 80 %, más del 90 % o más del 95 % de la afinidad de unión del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno con el Notch-1 humano.

En otro aspecto de esta forma de realización, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son humanizados, humanos o quiméricos. Preferentemente, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de este humanizados. Con mayor preferencia, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de este humanos.

En otro aspecto de esta forma de realización, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de este de ratón.

En otro aspecto de esta forma de realización, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se unen a Notch-1 humano con K_D de 1×10^{-5} M o menos.

Preferentemente, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se unen al Notch-1 humano con K_D de 1×10^{-6} M o menos, 5×10^{-7} M o menos, 2×10^{-7} M o menos, 1×10^{-7} M o menos, 5×10^{-8} M o menos, 2×10^{-8} M o menos o 1×10^{-8} M o menos.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno de este que se unen específicamente a Notch-1 humano, que comprende:

(i) una región variable CDR1 de la cadena pesada, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:18 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:18, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo;

(ii) una región variable CDR2 de la cadena pesada, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:19 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO: 19, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo; y

(iii) una región variable CDR3 de la cadena pesada, que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:20 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO: 20, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo.

En un aspecto de esta forma de realización, de las 12 posibles modificaciones en los residuos de aminoácidos (como se describió anteriormente en esta forma de realización) de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, cualquiera de las modificaciones, excepto hasta 6 de las modificaciones, es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas. Preferentemente, cualquiera de dichas modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, excepto hasta 5 de las modificaciones, es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas. Con mayor preferencia, cualquiera de dichas modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, excepto hasta 4 de las modificaciones, excepto hasta 3 de las modificaciones, excepto hasta 2 de las modificaciones o excepto hasta 1 modificación, es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas. Aun con mayor preferencia, cualquier modificación del residuo de aminoácido de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada es una sustitución conservadora

del residuo de aminoácido de estas.

En otro aspecto de esta forma de realización, no se modifica ninguna de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno de este que se unen específicamente al Notch-1, que comprende:

(i) una región variable CDR1 de la cadena liviana, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:12 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:12, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo;

(ii) una región variable CDR2 de la cadena liviana, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:13 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:13, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo; y,

(iii) una región variable CDR3 de la cadena liviana, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:14 o una variante de este, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO: 14, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo.

En un aspecto de esta forma de realización, de las 12 posibles modificaciones en los residuos de aminoácidos (como se describió anteriormente en esta forma de realización) de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana, cualquiera de sus modificaciones, excepto hasta 6 de las modificaciones, es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas. Preferentemente, cualquiera de dichas modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana, excepto hasta 5 de las modificaciones, es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas. Con mayor preferencia, cualquiera de dichas modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana, excepto hasta 4 de las modificaciones, excepto hasta 3 de las modificaciones, excepto hasta 2 de las modificaciones o excepto hasta 1 modificación, es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas. Aun con mayor preferencia, cualquiera de dichas modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana es una sustitución conservadora del residuo de

aminoácido de estas.

En otro aspecto de esta forma de realización, no se modifica ninguna de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno de este que se unen específicamente al Notch-1, que comprende:

- (i) una región variable CDR1 de la cadena pesada, que comprende SEQ ID NO: 18, o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:18, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo;
- (ii) una región variable CDR2 de la cadena pesada, que comprende SEQ ID NO: 19, o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:19, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo;
- (iii) una región variable CDR3 de la cadena pesada, que comprende SEQ ID NO: 20, o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:20, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo;
- (iv) una región variable CDR1 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 12, o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:12, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo;
- (v) una región variable CDR2 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 13, o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:13, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo; y
- (vi) una región variable CDR3 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 14, o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:14, preferentemente, se modifican solo 3 residuos, con mayor preferencia, se modifican solo 2 residuos, aun con mayor preferencia, se modifica solo 1 residuo.

En un aspecto de esta forma de realización, de las 24 posibles modificaciones en los residuos de aminoácidos (como se describió anteriormente en esta forma de realización) de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana, cualquiera de sus modificaciones, excepto hasta 12 de las modificaciones, es una sustitución

conservadora del residuo de aminoácido de estas. Preferentemente, cualquiera de dichas modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana, excepto hasta 11 de las modificaciones, es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas. Con mayor preferencia, cualquiera de dichas modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana, excepto hasta 10 de las modificaciones, excepto hasta 9 de las modificaciones, excepto hasta 8 de las modificaciones, excepto hasta 7 de las modificaciones, excepto hasta 6 de las modificaciones, excepto hasta 5 de las modificaciones, excepto hasta 4 de las modificaciones, excepto hasta 3 de las modificaciones, excepto hasta 2 de las modificaciones o excepto hasta 1 de las modificaciones, es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas. Aun con mayor preferencia, cualquiera de dichas modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana es una sustitución conservadora del residuo de aminoácido de estas.

En otro aspecto de esta forma de realización, no se modifica ninguna CDR de la cadena liviana ni ninguna CDR de la cadena pesada.

En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno compiten de manera cruzada o compiten por la unión al Notch-1 humano, con un anticuerpo que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; y
- (b) una región variable de la cadena liviana, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno compiten de manera cruzada o compiten por la unión al Notch-1 humano, con un anticuerpo que comprende:

- (i) una región variable CDR1 de la cadena pesada, que comprende SEQ ID NO: 18,
- (ii) una región variable CDR2 de la cadena pesada, que comprende SEQ ID NO: 19,
- (iii) una región variable CDR3 de la cadena pesada, que comprende SEQ

ID NO: 20,

(iv) una región variable CDR1 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 12,

(v) una región variable CDR2 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 13, y

(vi) una región variable CDR3 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 14,

en donde se pueden modificar 1-4 residuos amino de cada CDR de la cadena liviana y de cada CDR de la cadena pesada. Preferentemente, cualquier modificación de las CDR de la cadena liviana y de las CDR de la cadena pesada es una sustitución conservadora de los residuos de aminoácidos de estas. Con mayor preferencia, no se modifica ninguna CDR de la cadena liviana ni ninguna CDR de la cadena pesada.

La determinación de las regiones CDR es conocida por los expertos en el arte. Cabe destacar que en algunas formas de realización, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y Chothia (también denominadas "CDR combinadas" o "CDR extendidas"). En algunas formas de realización, las CDR son las CDR de Kabat. En otras formas de realización, las CDR son las CDR de Chothia. En otras palabras, en las formas de realización que tienen más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de Kabat, de Chothia, CDR combinadas o combinaciones de estas.

En un aspecto de las formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otro aspecto de las formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano. En otro aspecto de las formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

En otro aspecto de las formas de realización, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se une al Notch-1 humano con una constante de disociación en equilibrio K_D menor de 1×10^{-5} M, preferentemente, menor de 1×10^{-6} M, preferentemente, menor de 5×10^{-7} M, preferentemente, menor de 2×10^{-7} M, preferentemente, menor de 1×10^{-7} M, o aun con menor preferencia, menor de 1×10^{-8} M.

En otro aspecto de las formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón. En otro aspecto de esta forma de realización, el anticuerpo es humanizado, humano o quimérico. Preferentemente, el anticuerpo es humanizado. Con mayor preferencia, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.

En otro aspecto de esta forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo

humano de longitud completa de las subclases IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄. En otro aspecto de esta forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado de las subclases IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄. Aun en otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado de las subclases IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos o porciones de unión al antígeno descritos en la presente.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una línea celular que produce en forma recombinante cualquiera de los anticuerpos o porciones de unión al antígeno descritos en la presente.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un oligonucleótido que codifica la cadena pesada o la cadena liviana de cualquiera de los anticuerpos o porciones de unión al antígeno descritos en la presente.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de la invención, o una composición farmacéutica de este.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona los anticuerpos o la porción de unión al antígeno descritos en la presente para usar en el tratamiento del cáncer.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona el uso de los anticuerpos o de la porción de unión al antígeno descritos en la presente para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de las figuras/los dibujos

La Figura 1 ilustra la síntesis por PCR del cADN de un plásmido inmunogénico de Notch1 humano N1-NRR-TM(-), como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 2 también ilustra la síntesis por PCR del cADN de un plásmido inmunogénico de Notch1 humano N1-NRR-TM(+), como también se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 3 ilustra los resultados del ensayo indicador de luciferasa dependiente de Notch-1 de dos anticuerpos monoclonales: mAb N248A y mAb-C, como se muestra en el Ejemplo 3.

La Figura 4 ilustra que el ensayo indicador de luciferasa muestra que mAb N248A inhibe la señalización de Notch 1 inducida por Jagged-1. Las células Hela/Jagged1 y las células N1dP-c16 se cocultivaron para el ensayo indicador de

luciferasa. MlgG es un anticuerpo de ratón de control. Los números del eje y son lecturas de la actividad indicadora de luciferasa.

La Figura 5 es una alineación de secuencias de los dominios EFG, Lin-A, Lin-B, Lin-C, HD-N y HD-C entre el Notch1 humano y el Notch2 humano.

La Figura 6A es una imagen de Western blot que ilustra que el nivel de NICD (dominio intracelular de Notch1) fue reducido por mAb N248A en las células HPB-ALL.

La Figura 6B ilustra que el crecimiento de las células HPB-ALL es inhibido por mAb N248A.

Las Figuras 7A y 7B ilustran que mAb N248A bloquea la expresión del mRNA Hes1 y mRNA Hes4, respectivamente.

La Figura 8 ilustra la inhibición del crecimiento del xenoinjerto tumoral HBP-ALL mediante mAb N248A. Se administraron dosis de mAb a los ratones, como se indica en la figura, después de que el tumor creciera hasta 150-300 mm³. Cada grupo contiene 10 ratones con tamaños tumorales aleatorizados.

La Figura 9 ilustra los cambios en la concentración de mAb N248A plasmática después de una inyección de una sola dosis de 5 mg/kg en los ratones. Cada punto de datos se calculó sobre la base de tres ratones. $T_{1/2}$ es la vida media de N248A en el suero de ratón.

La Figura 10 ilustra la inhibición de NICD en los xenoinjertos tumorales HBP-ALL después de una inyección de una sola dosis de 5 mg/kg en los ratones. Las bandas de Western blot de los tumores tratados con el anticuerpo de control D16A se establecieron con 100 % de intensidad, lo que es igual a 0 % de inhibición.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, en particular, a anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales de ratón, así como anticuerpos quiméricos humanos/de ratón que se unen específicamente a Notch-1 con gran afinidad. La descripción proporciona anticuerpos aislados, métodos para la preparación de dichos anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden dichos anticuerpos, y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, los inmunoconjugados o las moléculas biespecíficas de la descripción. Asimismo, la descripción se refiere a métodos de uso de los anticuerpos, por ejemplo, para inhibir la activación de Notch-1 y para tratar enfermedades asociadas con la sobreactivación o sobreexpresión de Notch-1, tal como el crecimiento celular anormal (por ejemplo, cáncer). En consecuencia, la descripción también proporciona métodos de uso de anticuerpos anti Notch-1 o porciones de unión al

antígeno de este para tratar varios tipos de crecimiento celular anormal, tal como el cáncer.

Definiciones

Los términos "Notch-1" o "Notch1" se usan de manera indistinta e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especies de la proteína Notch-1 humana. La proteína Notch-1 humana natural, por ejemplo, está compuesta por un péptido líder, una región de repetición tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) grande, tres repeticiones Lin12, un dominio de heterodimerización del terminal N (HD-N), un dominio de heterodimerización del terminal C (HD-C), una secuencia de transmembrana (TM) y un dominio intracelular (NICD). El número de acceso a NCBI/GenBank del Notch-1 humano de longitud completa es NM_017617.2

Como se usan en la presente, las expresiones "región de regulación negativa de Notch-1" o "NRR de Notch-1", a menos que se indique lo contrario, se refieren a cualquier región de polipéptidos natural o sintética de Notch-1, que consiste en los tres dominios Lin12 y la secuencia o las secuencias de aminoácidos ubicadas entre los tres dominios Lin12 y el dominio de transmembrana Notch-1. En una forma de realización, "NRR de Notch-1" incluye los tres dominios Lin12 y dos dominios de heterodimerización, HD-N y HD-C, en donde los dominios HD-N y HD-C de Notch-1 se unen de manera covalente, pero aún no son escindidos por la proteasa tipo furina (antes de la escisión S1). En otra forma de realización, "NRR de Notch-1" incluye los tres dominios Lin12 y los dos dominios de heterodimerización, HD-N y HD-C, en donde los dominios HD-N y HD-C no se unen de manera covalente (después de la escisión S1). En un aspecto de esta forma de realización, el sitio S2 en el dominio HD-C no fue escindido por las metaloproteasas tipo ADAM. En otro aspecto particular de esta forma de realización, el sitio S2 en el dominio HD-C se escinde o ya fue escindido por las metaloproteasas tipo ADAM. (Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300).

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción, por ejemplo, de linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluso anticuerpos, citocinas y complemento) que da como resultado el daño selectivo, la destrucción o la eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas o, en el caso de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "vía de transducción de señal" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señal que cumplen una función en la transmisión de una señal desde una porción de una célula hasta otra porción de una célula. Como se usa en la presente, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal en toda la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente descripción es el receptor Notch-1.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") o cadenas simples de estos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por puente de disulfuro, o una porción de unión a antígeno de esta. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (que se abrevia en la presente como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (que se abrevia en la presente como V_L) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana está compuesta por un dominio C_L . Las regiones V_H y V_L también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Las regiones CDR se pueden determinar usando los sistemas de numeración de Kabat o Chothia, ambos conocidos por los expertos en el arte. Véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluso varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema complementario clásico.

Como se usa en la presente, la expresión "porción de unión al antígeno" de un

anticuerpo (o simplemente "porción del anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, Notch-1). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos por la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos de Fab unidos por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Asimismo, si bien los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , son codificados por genes diferentes, pueden unirse por métodos recombinantes, mediante un ligador de síntesis que les permite formar una cadena proteica simple, en donde las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenaria (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). La expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo también abarca dichos anticuerpos monocatenarios. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden obtener mediante cualquier técnica adecuada, incluso las técnicas convencionales conocidas por los expertos en el arte, y se pueden analizar los fragmentos para determinar su utilidad de la misma manera que con los anticuerpos intactos.

Como se usa en la presente, un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a Notch-1 es sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de Notch-1). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a Notch-1 puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de Notch-1 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede ser sustancialmente libre de otros productos químicos y/o materiales celulares.

Como se usan en la presente, las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de una composición molecular simple. La composición de

anticuerpos monoclonales muestra una afinidad y especificidad de unión simple para un epítipo en particular.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en donde las secuencias de CDR que derivan de la línea germinal de otras especies de mamíferos, como ratón, se injertaron en secuencias de marco humanas. Pueden realizarse modificaciones adicionales de las regiones de marco en las secuencias de marco humanas.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos en donde las secuencias de la región variable derivan de una especie, y las secuencias de la región constante derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en donde las secuencias de la región variable derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante derivan de un anticuerpo humano.

Como se usan en la presente, las expresiones "anticuerpo humano" o "anticuerpo completamente humano" incluyen anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones de marco y las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulinas germinales humanas. Asimismo, si el anticuerpo contiene una región constante, esta también deriva de las secuencias de inmunoglobulinas germinales humanas. Los anticuerpos humanos de la descripción o las porciones de unión al antígeno de estos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas germinales humanas (por ejemplo, mutaciones incorporadas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en donde las secuencias de CDR que derivan de la línea germinal de otras especies de mamíferos, como ratón, se injertaron en secuencias de marco humanas.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal humano" o "anticuerpo monoclonar completamente humano" se refieren a anticuerpos que muestran una especificidad de unión simple que tienen regiones variables, en donde las regiones de marco y las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulinas germinales humanas. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena liviana fusionado a una célula inmortalizada.

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma

modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo humano recombinante" incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparados de estos (descritos en detalle más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una colección de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por otros medios que incluyen el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humanas con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables, en donde las regiones de marco y las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulinas germinales humanas. En ciertas formas de realización, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por ello, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan de secuencias germinales humanas V_H y V_L y se relacionan con ellas, es posible que no existan de manera natural en el repertorio germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término "competir", como se usan en la presente con respecto a un anticuerpo, se refiere a cuando un primer anticuerpo o una porción de unión al antígeno de este compiten para unirse a un segundo anticuerpo o a una porción de unión al antígeno de este, en donde la unión del primer anticuerpo con su epítipo cognado disminuye de manera notable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. Alternativamente, es posible que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también disminuya de manera notable en presencia del primer anticuerpo, pero no es necesariamente el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de manera notable la unión del otro anticuerpo con su ligando o epítipo cognado en menor, igual o mayor grado, se dice que los anticuerpos "compiten de manera cruzada" entre sí para unirse a sus epítopos respectivos. Por ejemplo, los

anticuerpos que compiten de manera cruzada pueden unirse al epítipo, o a una porción del epítipo, al cual se unen los anticuerpos descritos en la presente. La presente descripción abarca el uso de anticuerpos que compiten y de anticuerpos que compiten de manera cruzada. Independientemente del mecanismo mediante el cual se produce dicha competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común o a una porción de este, y similares), los expertos en el arte comprenderán, en función de las explicaciones que se brindan en la presente, que los anticuerpos que compiten y/o los que compiten de manera cruzada están incluidos y pueden ser útiles para los métodos descritos en la presente.

Como se usa en la presente, un "epítipo principal" se refiere a un epítipo, en donde cualquiera de los residuos de aminoácidos del epítipo es reemplazado por una alanina o una sustitución conservadora; la afinidad de unión del anticuerpo al antígeno al que pertenece el epítipo disminuye más del 50 %.

Como se usa en la presente, "isotipo" o "clase" se refieren a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG) que es codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada. Los dominios constantes de los anticuerpos no están involucrados en la unión al antígeno, pero muestran varias funciones efectoras. En función de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, puede asignarse una determinada inmunoglobulina o anticuerpo humano a una de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Se conocen las estructuras y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas. De las varias clases de inmunoglobulinas humanas, se sabe que solo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM humanas activan el complemento. Se sabe que IgG1 e IgG3 humanas median ADCC en seres humanos.

Como se usa en la presente, "subclase" se refiere a la especificación adicional en un isotipo del gen de la región constante de la cadena pesada, por ejemplo, las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en el isotipo IgG.

Como se usan en la presente, "compuesto" o "compuesto farmacéutico" incluyen anticuerpos, porciones de unión al antígeno de este, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan en la presente de manera indistinta con la frase "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Las expresiones "receptor Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que

se une a la región Fc de un anticuerpo. Por ejemplo, el FcR puede ser un FcR humano de secuencia natural. Asimismo, el FcR puede ser uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRIV, incluso las variantes alélicas y, alternativamente, las formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren, principalmente, en los dominios citoplasmáticos de estos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo activador del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo inhibidor del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Se hace una reseña de los FcR en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluso aquellos que se identificarán en el futuro, se encuentran comprendidos en el término "FcR" de la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG materno al feto (Guyer et al., *Immunol.*, 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

Como se usa en la presente, un anticuerpo que "se une específicamente al Notch-1 humano" se refiere a un anticuerpo que se une al Notch-1 humano con K_D de 1×10^{-5} M o menos.

Como se usan en la presente, el término " k_{on} " se refiere a la constante de asociación (*on-rate*) de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " k_{off} " se refiere a la constante de disociación (*off-rate*) de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Como se usa en la presente, el término " K_D " se refiere a la constante de disociación en equilibrio que se obtiene de la relación entre k_{off} y k_{on} (es decir, k_{off}/k_{on}) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D de los anticuerpos se pueden determinar usando métodos establecidos en el arte. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante resonancia plasmónica superficial, por lo general, con un sistema biosensor, tal como un sistema Biacore®.

Como se usa en la presente, la expresión "gran afinidad" para un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1×10^{-6} M o menos.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Receptor Notch-1 humano

El cADN del Notch1 humano codifica una proteína de 2556 residuos de aminoácidos de un péptido líder, 36 repeticiones tipo EGF, una región de regulación negativa (NRR), una secuencia de transmembrana (TM) y un dominio intracelular. (Vardar et al., Biochemistry 2003, 41: 7061-7067; Sanchez-Irizarry et al., Mol. Cell. Biol. 2004, 24: 9265-9273; Gordon, W.R., et.al, Nature Structural &Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300). La NRR de Notch-1 comienza en el residuo 1447 de aminoácidos y finaliza en el 1734. La NRR de Notch-1 consiste en LNR-A (residuos 1447-1483 AA Notch-1), LNR-B (residuos 1484-1525 AA Notch-1), LNR-C (residuos 1526-1565 AA Notch-1), dominio de heterodimerización del terminal N (HD-N, residuos 1566-1665 AA Notch-1) y dominio de heterodimerización del terminal C (HD-C, residuos 1666 a 1734 AA Notch-1).

Los anticuerpos de la descripción se caracterizan por tener características o propiedades funcionales particulares. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente al Notch-1 humano con K_D de 1×10^{-5} M o menos. Preferentemente, un anticuerpo de la descripción se une a Notch-1 con gran afinidad, por ejemplo, con K_D de 1×10^{-6} M o menos, con mayor preferencia, K_D de 1×10^{-7} M o menos, aún con mayor preferencia, K_D de 1×10^{-8} M o menos.

Los ensayos para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a Notch-1 incluyen, entre otros, los análisis ELISA, Western blot, RIA y citometría de flujo. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos también se puede evaluar por medio de ensayos conocidos en el arte, tal como el análisis Biacore.

Anticuerpo monoclonal mAb N248A.

Un anticuerpo ilustrativo de la descripción es el anticuerpo monoclonal de ratón N248A, generado, aislado, probado y caracterizado estructuralmente como se describe en los Ejemplos 1-3 y 8. En la Tabla 1, se enumeran las secuencias de aminoácidos de varias regiones mAb N248A y otras secuencias que se describen en la presente.

Tabla 1

Secuencia		SEQ ID N.º
Secuencia de nucleótidos	de de	1
ATGCCGCCGCTCCTGGCACCTCTGCTCTGCCTG GCACTGCTACCCGCTCTCGCTGCACGAGGTCCG		

inmunogén NRR-TM(-)	Notch1-	CGATGCTCCCAACCAGGTGAGACCTGCCTGAAT GGAGGTAAGTGTGAAGCAGCCAATGGCACGTGC CTGTGCCTGGGCCCCTTCACGGGCCCCGAATGC CAGTTCCCGGCCAGCAGCCCCTGCCTGGGCGG CAACCCCTGCTACAACCAGGGGACCTGTGAGCC CACATCCGAGAGCCCCTTCTACCGTTGCCTGTG CCCCGCCAAATTCAACGGGCTCTTGTGCCACATC CTGGACTACAGCTTCGGGGGTGGGGCCGGGCG CGACATCCCCCGCCGCTGATCGAGGAGGCGTG CGAGCTGCCCCGAGTGCCAGGAGGACGCGGGCA ACAAGGTCTGCAGCCTGCAGTGCAACAACCACG CGTGCGGCTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCA ACTTCAATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCAGTC TCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGCCA CTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGCTGCCT CTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTGCGGAAGG CCAGTGCAACCCCTGTACGACCAGTACTGCAA GGACCACTTCAGCGACGGGCACTGCGACCAGG GCTGCAACAGCGCGGAGTGCGAGTGGGACGGG CTGGACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGAGGCTG GCGGCCGGCACGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GCCGCCGGAGCAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCA CTTCCTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACAC CAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGGCCA GCAGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGCGAGGA GGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGCCGC CGAGGGCTGGGCCGCACCTGACGCCCTGCTGG GCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCCTGGTGGCA GCGAGGGTGGGCGGCGGCGGAGGGAGCTGGA CCCCATGGACGTCCGCGGCTCCATCGTCTACCT GGAGATTGACAACCGGCAGTGTGTGCAGGCCTC CTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCACCGACGTGGC CGCATTCTGGGAGCGCTCGCCTCGCTGGGCAG CCTCAACATCCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCA GAGTGAGACCGTGGAGCCGCCCCCGCCGGCGC
------------------------	---------	---

		AGAAGCGCCGGCGGCAGCATGGCCAGCTCTGG TTCCCTGAGGGCTTCAAAGTGTCTGAGGCCAGC AAGAAGAAGCGGCGGGAGCCCCCTCGGCGAGGA CTCCGTGGGCCTCAAGCCCCTGAAGAACGCTTC AGAC	
Secuencia de aminoácidos de inmunogén Notch1- NRR-TM(-)		MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGG KCEAANGTCLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPC YNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSF GGGAGRDIPPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQC NNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF SDGHCDSSQCNSAGCLFDGFDQRAEGQCNPLYD QYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVP ERLAAGTLVVVLMPPPEQLRNSSFHFLRELSRVLH TNVVKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAE GWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPM VRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFLGA LASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQKRRRQHG QLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNA SD	2
Secuencia de nucleótidos de inmunogén Notch1- NRR-TM(+)		ATGCCTCCGCTCCTGGCACCTCTGCTCTGCCTG GCACTGCTACCCGCTCTCGCTGCACGAGGTCCG CGATGCTCCCAACCAGGTGAGACCTGCCTGAAT GGAGGTAAGTGTGAAGCAGCCAATGGCACGTGC CTGTGCCTGGGCCCCCTCACGGGCCCCGAATGC CAGTTCCCGGCCAGCAGCCCCTGCCTGGGCGG CAACCCCTGCTACAACCAGGGGACCTGTGAGCC CACATCCGAGAGCCCCTTCTACCGTTGCCTGTG CCCCGCCAAATTCAACGGGCTCTTGTGCCACATC CTGGACTACAGCTTCGGGGGTGGGGCCGGGCG CGACATCCCCCGCCGCTGATCGAGGAGGCGTG CGAGCTGCCCCGAGTGCCAGGAGGACGCGGGCA ACAAGGTCTGCAGCCTGCAGTGCAACAACCACG CGTGCGGCTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCA ACTTCAATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCAGTC TCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGCCA	3

		CTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGCTGCCT CTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTGCGGAAGG CCAGTGCAACCCCCTGTACGACCAGTACTGCAA GGACCACTTCAGCGACGGGCACTGCGACCAGG GCTGCAACAGCGCGGAGTGCGAGTGGGACGGG CTGGACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGAGGCTG GCGGCCGGCACGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GCCGCCGGAGCAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCA CTTCCTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACAC CAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGGCCA GCAGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGCGAGGA GGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGCCGC CGAGGGCTGGGCCGCACCTGACGCCCTGCTGG GCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCCTGGTGGCA GCGAGGGTGGGCGGCGGCGGAGGGAGCTGGA CCCCATGGACGTCCGCGGCTCCATCGTCTACCT GGAGATTGACAACCGGCAGTGTGTGCAGGCCTC CTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCACCGACGTGGC CGCATTCTGGGAGCGCTCGCCTCGCTGGGCAG CCTCAACATCCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCA GAGTGAGACCGTGGAGCCGCCCCCGCCGGCGC AGCTGCACTTCATGTACGTGGCGGGCGGCCCT TTGTGCTTCTGTTCTTCGTGGGCTGCGGGGTGCT GCTGTCC	
Secuencia de aminoácidos de inmunogén Notch1-NRR-TM(+)	MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGG KCEAANGTCLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPC YNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSF GGGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQC NNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF SDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAEGQCNPLYD QYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVP ERLAAGTLVVVLMPPQLRNSSFHFLRELSRVLH TNVVFKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAE GWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPM VRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGA	4	

	LASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMVAA AAFVLLFFVGCGVLLS	
Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de mAb N248A	CAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTG ATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGC AAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAACTACTGGA TGGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCC TTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGGG GTAGAACTAACTACAATGAGAACTTCAAGGGCAA GGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACA GTCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGAGG ACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTCCACAG CTCGGCCTATTACTATACTATGGACTACTGGGGT CAAAGAACCTCGGTCACCGTCTCCTCA	5
Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de mAb N248A	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFS <u>SNYWM</u> <u>EWVKQRPGHGLEWIGEILPGRGR</u> TNYNENFKGKA TFTADTSSNTVYMQNLNLTSEDSAVYYCAR <u>FHSSA</u> <u>YYTMDYWGQRTSVTVSS</u>	6
Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana de mAb N248A	CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCA CATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTCG CTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACTAGTAACTAT GCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTAT TCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGC TCCAGGTATTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTG ATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGG GCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTG CTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGTG GAGGAACCAAACCTGACTGTCCTA	7
Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de mAb N248A	QAVVTQESALTTSPGETVTLT <u>CRSSTGAVTTSNYA</u> <u>NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGIPARFSGSLIG</u> DKAALTITGAQTEDEAIYFC <u>ALWYSNHWVFGGGTK</u> LTVL	8
Secuencia de nucleótidos de la	CGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACTAGTAACT ATGCCAAC	9

región variable de la cadena liviana CDR1 de mAb N248A		
Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana CDR2 de mAb N248A	GGTACCAACAACCGAGCTCCA	10
Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana CDR3 de mAb N248A	GCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTG	11
Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana CDR1 de mAb N248A	RSSTGAVTTSNYAN	12
Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana CDR2 de mAb N248A	GTNNRAP	13
Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana CDR3 de mAb N248A	ALWYSNHWV	14
Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada CDR1 de mAb N248A	AACTACTGGATGGAG	15
Secuencia de nucleótidos de la	GAGATTTTACCTGGAAGGGGTAGAACTAACTACA ATGAGAACTTCAAGGGC	16

región variable de la cadena pesada CDR2 de mAb N248A		
Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada CDR3 de mAb N248A	TTCCACAGCTCGGCCTATTACTATACTATGGACT AC	17
Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada CDR1 de mAb N248A	NYWME	18
Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada CDR2 de mAb N248A	EILPGRGRNYYNENFKG	19
Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada CDR3 de mAb N248A	FHSSAYYYTMDY	20
Secuencia de nucleótidos de NRR de Notch-1 humano (LinA, LinB Lin C, HD-N y HD-C)	<u>GAGGAGGCGTGCGAGCTGCCCGAGTGCCAGGA</u> <u>GGACGCGGGCAACAAGGTCTGCAGCCTGCAGTG</u> <u>CAACAACCACGCGTGCGGCTGGGACGGCGGTG</u> <u>ACTGCTCCCTCAACTTCAATGACCCCTGGAAGAA</u> <u>CTGCACGCAGTCTCTGCAGTGCTGGAAGTACTTC</u> <u>AGTGACGGCCACTGTGACAGCCAGTGCAACTCA</u> <u>GCCGGCTGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGCCAG</u> <u>CGTGCGGAAGGCCAGTGCAACCCCCTGTACGAC</u> <u>CAGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGCAC</u> <u>TGCGA</u> <u>CCAGGGCTGCAACAGCGCGGAGTGCGAGTGGG</u> <u>ACGGGCTGGACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGA</u>	21

	GGCTGGCGGCCGGGCACGCTGGTGGTGGTGGTG CTGATGCCGCCGGAGCAGCTGCGCAACAGCTCC TTCCACTTCCTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTG CACACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGCACAC GGCCAGCAGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGC GAGGAGGAGCT GCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGCCGCCGAGG GCTGGGCCGACCTGACGCCCTGCTGGGCCAG GTGAAGGCCTCGCTGCTCCCTGGTGGCAGCGAG GGTGGGCGGCGGCGGAGGGAGCTGGACCCCAT <u>GGACGTCCGCGGCTCCATCGTCTACCTGGAGAT</u> <u>TGACAACCGGCAGTGTGTGCAGGCCTCCTCGCA</u> <u>GTGCTTCCAGAGTGCCACCGACGTGGCCGCATT</u> <u>CCTGGGAGCGCTCGCCTCGCTGGGCAGCCTCAA</u> <u>CATCCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGA</u> <u>GACCGTGGAGCCGCCCGCCGGCGCGCAG</u> LinA, LinB, LinC, HD-N y HD-C se marcan mediante subyrado alterno.	
Secuencia de aminoácidos de NRR de Notch-1 humano (LinA, LinB Lin C, HD- N y HD-C)	<u>EEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGD</u> <u>CSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCD SQNS</u> <u>AGCLFDGFDCQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGH</u> <u>CDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVV</u> <u>LMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQ</u> <u>QMIFPYYGREEELRKHPKRAAEGWAAPDALLGQV</u> <u>KASLLPGGSEGGRRRRELDPMDV RGSIVYLEIDNR</u> <u>QCVQASSQCFQSATDVAAFLGALASLGSLNIPYKIE</u> <u>AVQSETVEPPPPAQ</u> LinA, LinB, LinC, HD-N y HD-C se marcan mediante subrayado alterno y sombreado gris.	22

Como se indica en el Ejemplo 4, mAb N248A tiene una K_D menor de $0,33 \times 10^{-6}$ M.

Como se indica en el Ejemplo 5, se demostró que mAb N248A se une al menos a dos epítomos Notch-1 diferenciables; un epítomo se encuentra en el dominio Lin-A y el otro epítomo se encuentra en el dominio HD-C.

Como se indica en el Ejemplo 6, mAb N248A inhibe tanto la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL) como el crecimiento celular del cáncer de mama en el cultivo celular.

Como se indica en el Ejemplo 7, mAb N248A también inhibe la leucemia linfoblástica de linfocitos T en el modelo de xenoinjerto tumoral murino.

Anticuerpos anti Notch-1 que se unen al menos a dos epítopos diferenciables en el dominio Lin-A de Notch-1 y en el dominio HD-C de Notch-1.

En la presente invención, se contempla que los anticuerpos que se unen a los dominios Lin-A y HD-C de Notch-1 con gran afinidad reducirán la transducción de señal de Notch-1 y, por lo tanto, pueden mostrar actividad biológica *in vitro* e *in vivo* para inhibir el crecimiento celular del cáncer, en particular, el crecimiento celular del cáncer T-ALL. Dichos anticuerpos pueden producirse de acuerdo con los métodos generales conocidos por los expertos en el arte. En una forma de realización, dichos anticuerpos se pueden producir por inmunización de un ratón con un inmunogén que comprende el dominio LinA de Notch-1 y el dominio HD-C de Notch-1, como se indica en los Ejemplos 1 y 2, seguido de la clonación de hibridomas de los anticuerpos generados de esta manera y el análisis de los anticuerpos clonados mediante el ensayo ELISA, como se indica en el Ejemplo 2. La afinidad de unión de Notch-1 de los anticuerpos seleccionados de acuerdo con el ensayo ELISA se puede medir en con instrumento de resonancia plasmónica superficial Biacore 3000, como se indica en el Ejemplo 4.

Los anticuerpos anti Notch-1 de la presente invención, en donde los anticuerpos que se unen al dominio LinA de Notch-1 y al dominio HD-C de Notch-1, se pueden producir por cualquier otro método conocido en el arte diferente del descrito en el párrafo anterior. Por lo general, la vía y el programa de inmunización del animal huésped se adaptan a las técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos, como también se describe en la presente. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en el arte y/o se describen en la presente.

Anticuerpos anti Notch-1 generados por tecnologías de hibridoma.

En la presente invención, se contempla que cualquier sujeto mamífero, incluso seres humanos, o las células productoras de anticuerpos de estos, se pueden manipular para que funcionen como base para la producción de líneas celulares de

hibridoma de mamíferos, incluso de seres humanos. Por lo general, el animal huésped se inocula de manera intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunogén, como se describe en la presente.

Los hibridomas se pueden preparar de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas usando la técnica de hibridación celular somática general de Kohler, B. and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 o la modificación de Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982). En la hibridación, se pueden usar líneas de mieloma disponibles que incluyen, entre otras, X63-Ag8.653 y las de Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE. UU. Por lo general, la técnica implica la fusión de células de mieloma y de células linfoides usando un fusogen, tal como polietilenglicol, o por medios eléctricos conocidos por los expertos en el arte. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y crecen en un medio de crecimiento selectivo, tal como un medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar las células de origen no hibridadas. Se puede usar cualquiera de los medios descritos en la presente, enriquecidos con o sin suero, para el cultivo de hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden usar linfocitos B inmortalizados por EBV para producir los anticuerpos monoclonales Notch-1 de la invención. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se someten a un ensayo para determinar la actividad antiinmunogénica mediante procedimientos de inmunoensayos convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo por fluorescencia).

Los hibridomas que se pueden usar como fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células de la progenie de los hibridomas de origen que producen anticuerpos monoclonales específicos para Notch-1, o una porción de este.

Los hibridomas que producen dichos anticuerpos pueden crecer *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse del medio de cultivo o de los fluidos corporales mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede retirarse, por ejemplo, vertiendo la preparación sobre adsorbentes preparados con el inmunogén unido a una fase sólida, y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados fuera del inmunogén. La inmunización de un animal huésped con un Notch-1 humano o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos blanco conjugada a una proteína inmunogénica

en las especies que se desean inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (*keyhole limpet*), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación mediante residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes, puede permitir la obtención de una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Humanización de anticuerpos anti Notch-1 generados mediante la inmunización en un animal huésped.

En la presente invención, se contempla que los anticuerpos anti Notch-1 de la invención, en donde los anticuerpos son generados mediante la inmunización en un animal huésped, se pueden manipular de diversas maneras para aumentar su actividad biológica y sus propiedades farmacéuticas. Una forma de manipulación es la humanización.

Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de los dominios variables livianos y pesados del anticuerpo de inicio; (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región de marco del anticuerpo usar durante el proceso de humanización; (3) las metodologías/técnicas de humanización reales; y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 4.816.567, 5.807.715, 5.866.692, 6.331.415, 5.530.101, 5.693.761, 5.693.762, 5.585.089 y 6.180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpos "humanizados" que comprenden un sitio de unión al antígeno que deriva de una inmunoglobulina no humana, incluso los anticuerpos quiméricos que tienen regiones de roedores o regiones V de roedores modificadas, y sus CDR asociadas fusionadas a los dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1987), y Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). Otras referencias describen CDR de roedores injertadas en una región de marco (FR) de soporte humana antes de la fusión con un dominio constante del anticuerpo humano adecuado. Véase, por ejemplo, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeven et al. *Science* 239:1534-1536 (1988), y Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986). Otras referencias describen CDR de roedores con el soporte de regiones de

marco de roedores modificadas por ingeniería genética de manera recombinante. Véase, por ejemplo, la publicación de patente europea N.º 0519596. Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar la respuesta inmunitaria no deseada hacia las moléculas de anticuerpos antihumanas de roedores, lo cual limita la duración y la eficacia de las aplicaciones terapéuticas de estas porciones en los receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo se puede modificar por ingeniería genética de manera que sea inerte desde el punto de vista inmunitario (por ejemplo, no desencadena la lisis del complemento). Véanse, por ejemplo, la publicación PCT N.º PCT/GB99/01441; la solicitud de patente del Reino Unido N.º 9809951,8. Otros métodos de humanización de anticuerpos que también se pueden utilizar se describen en Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 (1991) y en las patentes estadounidenses N.º 6.180.377, 6.054.297, 5.997.867, 5.866.692, 6.210.671 y 6.350.861; y en la publicación PCT N.º WO 01/27160.

Anticuerpos anti Notch-1 humanos.

En la presente invención, se contempla que los anticuerpos anti Notch-1 completamente humanos se pueden obtener usando ratones disponibles en el comercio que se modificaron por ingeniería genética para que expresen proteínas de inmunoglobulina humana específica. Los animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmunitaria más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más intensa también se pueden usar para la generación de anticuerpos humanos o humanizados. Los ejemplos de dicha tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En la presente invención, también se contempla que los anticuerpos anti Notch-1 completamente humanos se pueden obtener de manera recombinante de acuerdo con los métodos generales de tecnología de expresión en fago. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5.565.332, 5.580.717, 5.733.743 y 6.265.150; y Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994).

De manera alternativa, la tecnología de expresión en fago (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios génicos de dominios variables (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpos se clonan, en el marco, en un gen de la proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o

fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones realizadas en función de las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por ello, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La expresión en fago puede llevarse a cabo en una variedad de formatos; para una reseña, véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Para la expresión en fago, se pueden usar numerosas fuentes de segmentos del gen V. Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) aislaron una disposición diversa de anticuerpos antioxazolona de una pequeña colección combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados, y pueden aislarse anticuerpos de una disposición diversa de antígenos (incluso los autoantígenos) esencialmente de acuerdo con las técnicas descritas por Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) o Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). En una respuesta inmunitaria natural, los genes del anticuerpo acumulan mutaciones a gran velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán mayor afinidad, y preferentemente, los linfocitos B que muestran inmunoglobulina de superficie con mayor afinidad se replican y se diferencian durante la posterior exposición al antígeno. Este proceso natural se puede imitar utilizando la técnica denominada "intercambio de cadenas" (*chain shuffling*). (Marks et al., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). En este método, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos mediante expresión en fago se puede mejorar mediante el reemplazo secuencial de los genes de la región V de la cadena liviana y de la cadena pesada por repertorios de variantes naturales (repertorios) de genes del dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos con afinidades en el rango pM-nM. Una estrategia para obtener repertorios de anticuerpos de fago muy grandes (también denominada "la madre de todas las colecciones") se describió en Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993).

La transposición génica también se puede usar para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores, en donde el anticuerpo humano tiene especificidades y afinidades similares a las del anticuerpo del roedor de inicio. De acuerdo con este método, que también se denomina "impresión del epítipo", el gen del dominio V de la cadena liviana o de la cadena pesada de anticuerpos de roedores

obtenidos mediante la técnica de expresión en fago se reemplaza por un repertorio de genes del dominio V humano, lo cual permite crear quimeras de roedores-humanos. La selección de antígenos da como resultado el aislamiento de las regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de unión al antígeno funcional, es decir, el epítipo controla (imprime) la elección del compañero. Cuando el proceso se repite a fin de poder reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación PCT N.º WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedores mediante el injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de marco ni de CDR de roedor.

Si bien el análisis anterior se relaciona con anticuerpos humanos y humanizados, los principios generales analizados se pueden aplicar a anticuerpos personalizados para usar, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Pueden combinarse uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descritos en la presente, por ejemplo, injerto de CDR, mutación de marco y mutación de CDR.

Anticuerpos anti Notch-1 manipulados por ingeniería genética y modificados, obtenidos de manera recombinante.

Por lo general, los anticuerpos se pueden obtener de manera recombinante mediante la colocación de las secuencias de ADN del anticuerpo deseado en vectores de expresión, seguido de la transfección y expresión en células huésped, que incluyen, entre otras, las células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que, de otro modo, no producen proteínas de inmunoglobulina. Publicación de patente PCT N.º WO 87/04462. También pueden usarse otras células huésped, tales como células de plantas transgénicas o células de leche transgénica. Véase, por ejemplo, Peeters, et al. *Vaccine* 19:2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65 (1995); y Pollock, et al., *J Immunol Methods* 231:147(1999).

Un anticuerpo también puede modificarse de manera recombinante. Por ejemplo, se puede usar el ADN de las regiones constantes de la cadena liviana y de la cadena pesada humanas, en lugar de las secuencias murinas homólogas del ADN de anticuerpo murino, Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851 (1984), o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de la totalidad o una parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina. De manera

similar, se pueden preparar anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti Notch-1 de la presente.

Las regiones variables del anticuerpo también se pueden modificar mediante injerto de CDR. Dado que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias de marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; la patente estadounidense N.º 5.225.539 otorgada a Winter, y las patentes estadounidenses N.º 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 otorgadas a Queen *et al.*)

En consecuencia, otro aspecto de la descripción se relaciona con un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión al antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada, que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, 19 y 20, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana, que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente. Por ello, dichos anticuerpos contienen las secuencias de CDR, V_H y V_L, de los anticuerpos monoclonales N248A, incluso pueden contener diferentes secuencias de marco de estos anticuerpos. Dichas secuencias de marco se pueden obtener de bases de datos públicas o de referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos germinales.

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar residuos de aminoácidos en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3, V_H y/o V_L, para así mejorar una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Se puede realizar mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir las mutaciones, y se puede evaluar el efecto de la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, mediante ensayos *in vitro* o *in vivo*, como se describe en la presente. Por lo general, se introducen modificaciones conservadoras (como se analiza más adelante). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Asimismo, por lo general, no se alteran más de 1, 2, 3, 4 o 5 residuos en una región CDR.

En los párrafos subsiguientes, se analizará en mayor detalle la sustitución conservadora y la maduración de afinidad del anticuerpo.

Mapeo de epítomos antigénicos a los que se une un anticuerpo

Los epítomos de unión de anticuerpos monoclonales de un antígeno se pueden mapear mediante varios métodos según el tipo de interacción entre antígeno y anticuerpo.

Si un anticuerpo se une a un solo epítomo que consiste en residuos de aminoácidos secuenciales en un antígeno, cuya unión generalmente no se ve afectada por cambios conformacionales del antígeno, el epítomo de unión se denomina epítomo lineal. Por lo general, se usa un método de barrido de péptido para identificar epítomos lineales de unión (véase *Journal of Immunological Methods*, Volume 315, Issues 1-2, páginas 11-18, August 2006), que requiere sintetizar una serie de péptidos de 10-15mer superpuestos que cubren la longitud completa de la secuencia antigénica. Los péptidos se disponen sobre una membrana de reticulación de proteínas en formato con puntos por duplicado. La afinidad de unión entre el anticuerpo y la disposición de los péptidos se analiza de modo similar a ELISA. Primero, la membrana con los péptidos dispuestos se incuba en 1 X PBST con 5 % de suero fetal de ternero para bloquear la unión no específica; luego, se incuba con anticuerpos de prueba o anticuerpos de control no específicos, seguido de incubación con anticuerpos secundarios etiquetados con HRP. La intensidad de unión del anticuerpo se lee con un instrumento de formación de imágenes para quimioluminiscencia.

De manera alternativa, se puede identificar un epítomo lineal de unión usando dominios de proteínas antigénicas que se muestran en la superficie celular de levadura (véase *Journal of Molecular Biology*, 365(1), 196-200, January 2007) o usando fragmentos de proteínas antigénicas que se muestran en la superficie celular bacteriana (véase *FEMS Microbiol. Lett.*, 226(2), 347-353, septiembre de 2003; y también *Nature Methods*, 5(12), 1039-1045, noviembre de 2008), seguido de separación citométrica de flujo o FACS.

La proteólisis limitada del complejo de antígeno peptídico y anticuerpo, combinada con espectrometría de masa, puede brindar otro enfoque para localizar los epítomos lineales de unión (véase *Methods Mol. Biol.*, 524, 87-101, 2009). El antígeno y el anticuerpo se mezclan e incuban en condiciones adecuadas para formar un complejo de unión, que es digerido por proteasa en condiciones controladas de temperatura y tiempo. Luego, la mezcla de reacción unida se pasa a través de una

columna de afinidad de proteína A a fin de retener el anticuerpo unido con un fragmento del epítipo antigénico, que se analiza mediante espectrometría de masa luego de eluirlo de la columna.

El mapeo de epítomos conformacionales depende de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno en su conformación natural. Se informaron varias técnicas útiles para determinar epítomos conformacionales. Uno de los métodos que se usan habitualmente es la mutagénesis de aminoácidos. Se muta cada uno de los residuos de aminoácidos en la proteína antigénica que se supone se une al anticuerpo, y luego, la proteína antigénica mutada se expresa y se somete a análisis de unión de anticuerpos para determinar si la afinidad de unión es deficiente. Sin embargo, la mutagénesis sistemática de aminoácidos en la secuencia de proteínas antigénicas completa es una labor dificultosa. Para reducir las regiones de proteínas antigénicas que interactúan con los anticuerpos, la sustitución de un dominio antigénico individual por un dominio proteico estrechamente relacionado puede ser un método útil (véase J. Biol. chem., 274 (14) 9617-9626, April 1999).

El mapeo de mutagénesis *shotgun* se desarrolló para superar las desventajas de la mutagénesis de aminoácidos convencional (véase J. American Chem. Soc, 131, 6952-6954, 2009). Este método usa una colección de mutación abarcativa obtenida de cADN de antígeno, en donde cada clon de plásmido contiene una mutación puntual única, y la biblioteca de mutación completa cubre cada aminoácido de la región codificante antigénica. La colección de clones de plásmido se transfecta en células HEK-293T u otras células humanas, y luego, las células se disponen en microplacas de 384 cavidades. La actividad de unión del anticuerpo se evalúa luego de la fijación de las células en la microplaca. Si las mutaciones de aminoácidos causan una pérdida de reactividad, se define como epítipo de unión a anticuerpos.

La cocrystalización del complejo antígeno-anticuerpo, la difracción de rayos X y el análisis estructural proporciona visualización de dirección de la interacción de antígeno-anticuerpo. Cuando se combinan con mutagénesis de aminoácidos, las tecnologías brindan pruebas contundentes y una representación gráfica de los epítomos de unión a anticuerpos. Sin embargo, la cocrystalización y el análisis estructural presentan desafíos técnicos, requieren una gran cantidad de antígenos y anticuerpos purificados y pueden ser ensayos que demanden mucho tiempo y un proceso de error.

A fin de obtener un anticuerpo anti Notch-1 que se une a un epítipo o a un conjunto específico de epítomos, se pueden generar anticuerpos anti Notch-1 y luego

determinar el epítopo o el conjunto de epítopos a los que se une cada uno de estos anticuerpos de acuerdo con el método de mapeo anterior conocido en el arte. Luego, se pueden seleccionar los anticuerpos anti Notch-1 que se unen al epítopo específico o al conjunto específico de epítopos.

Sustituciones conservadoras

Como se indicó previamente, un anticuerpo también se puede modificar de manera recombinante por la sustitución conservadora de uno o más de los residuos de aminoácidos del anticuerpo o mediante una o más eliminaciones o adiciones de aminoácidos del anticuerpo.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones del terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones del terminal incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el terminal N o el anticuerpo fusionado a una etiqueta de epítopo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al terminal N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en la circulación sanguínea.

A las variantes de sustitución se les retira, al menos, un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo y se les inserta un residuo diferente en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones FR. Las sustituciones conservadoras se indican en la Tabla 2. Si las sustituciones dan como resultado un cambio de actividad biológica, se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en la Tabla 2 o como se describe más adelante en relación con las clases de aminoácidos, y se pueden analizar los productos.

Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones de ejemplo
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala

Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones de ejemplo
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Las modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del anticuerpo se logran mediante la selección de sustituciones que difieren considerablemente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en función de las propiedades de cadena lateral que tienen en común:

- (1) No polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polar sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Ácido (carga negativa): Asp, Glu;
- (4) Básico (carga positiva): Lys, Arg;
- (5) Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromático: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservadoras se obtienen intercambiando un miembro de una de estas clases por otra clase.

También se puede sustituir cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación correcta del anticuerpo, por lo general, con serina, a fin de mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anormal. Por el contrario, se pueden agregar enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, en particular, cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv.

Anticuerpos anti Notch-1 maduros con afinidad

La invención incluye formas de realización maduras con afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos maduros con afinidad se pueden producir mediante procedimientos conocidos en el arte (Marks et al. (1992) *Bio/Technology*, 10:779-783; Barbas et al. (1994) *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813; Schier et al. (1995) *Gene*, 169:147-155; Yelton et al. (1995) *J. Immunol.*, 155:1994-2004; Jackson et al. (1995) *J. Immunol.*, 154(7):3310-9; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.*, 226:889-896; y la publicación PCT N.º WO2004/058184).

Los siguientes métodos se pueden usar para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una manera de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (por ejemplo, mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo, se denomina "mutagénesis por barrido de genoteca". Por lo general, la mutagénesis por barrido de genoteca funciona de la siguiente manera. Se reemplazan una o más posiciones de aminoácidos en la CDR por dos o más (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) aminoácidos mediante métodos conocidos en el arte. Esto genera pequeñas genotecas de clones (en algunas formas de realización, una por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). Por lo general, la genoteca también incluye un clon que comprende el aminoácido natural (no sustituido). Se analiza una pequeña cantidad de clones, por ejemplo, alrededor de 20-80 clones (según la complejidad de la genoteca), de cada genoteca para determinar la afinidad de unión al polipéptido objetivo (u otro agente de unión), y se identifican candidatos con una afinidad mayor, igual o menor, o sin afinidad.

En algunas formas de realización, se reemplaza cada posición de aminoácido en una CDR, en algunas formas de realización, una a la vez, por los 20 aminoácidos

naturales mediante métodos de mutagénesis conocidos en el arte. Esto genera pequeñas genotecas de clones, (en algunas formas de realización, una por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros, si se sustituyen los 20 aminoácidos en cada posición.

En algunas formas de realización, la genoteca que se analizará comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden ser en la misma CDR o en dos o más CDR. Por ello, la genoteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La genoteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones, en dos o más CDR. La genoteca puede comprender sustituciones en 3, 4, 5 o más posiciones; dichas posiciones se encuentran en 2, 3, 4, 5 o 6 CDR. La sustitución se puede preparar usando codones de baja redundancia. Véase, por ejemplo, la Tabla 2 de Balint et al., (1993) Gene 137(1):109-18). Cada CDR puede ser una CDR Kabat, una CDR Chothia o una CDR extendida.

Los candidatos con mejor unión se pueden secuenciar, y así identificar una sustitución de CDR que da como resultado una mejor afinidad; tal sustitución también se denomina sustitución "mejorada". Los candidatos que se unen también se pueden secuenciar, para así identificar una sustitución de CDR que retenga la unión.

Se pueden realizar múltiples rondas de análisis. Por ejemplo, los candidatos que comprenden una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de una o más CDR, con unión mejorada, también son útiles para el diseño de una segunda genoteca que contenga al menos el aminoácido original y sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, posición de aminoácido en la CDR donde un mutante de sustitución mostró una unión mejorada). La preparación y el análisis o la selección de esta genoteca se analizan en mayor detalle más adelante.

La mutagénesis por barrido de genoteca también proporciona un medio para caracterizar una CDR, siempre que la frecuencia de los clones con mejor, igual o menor afinidad, o sin afinidad, también brinde información sobre la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR retiene la unión cuando se cambia a los 20 aminoácidos, dicha posición se identifica como una posición que es poco probable que sea necesaria para la unión del antígeno. Por el contrario, si una posición de CDR retiene la unión solo en un pequeño porcentaje de sustituciones, dicha posición se identifica como una posición que es importante para la función de CDR. Por ello, los métodos de mutagénesis por barrido de genoteca generan información sobre las posiciones en las CDR que se pueden cambiar a varios aminoácidos diferentes

(incluso los 20 aminoácidos) y sobre las posiciones en las CDR que no se pueden cambiar o que solo se pueden cambiar a unos pocos aminoácidos.

Los candidatos con afinidad mejorada se pueden combinar en una segunda genoteca, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición, y también puede incluir sustituciones adicionales en esa posición, según la complejidad de la genoteca deseada o permitida mediante el método de análisis o selección previsto. Además, si se desea, la posición del aminoácido adyacente puede ser aleatoria para, al menos, dos o más aminoácidos. La aleatoriedad de los aminoácidos adyacentes puede permitir una flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante que, a su vez, puede permitir o facilitar la introducción de una gran cantidad de mutaciones mejoradas. La genoteca también puede comprender sustituciones en las posiciones que no mostraron afinidad mejorada en la primera ronda de análisis.

La segunda genoteca se analiza o selecciona para detectar miembros con afinidad de unión mejorada y/o alterada usando cualquier método conocido en el arte, que incluye examen mediante análisis de resonancia plasmónica superficial Biacore y selección mediante cualquier método conocido en el arte para la selección, incluso expresión de fago, expresión de levadura y expresión de ribosoma.

Modificación posterior a la traducción de anticuerpos anti Notch-1

Los anticuerpos también se pueden modificar mediante modificaciones posteriores a la traducción, que incluyen, entre otras, glucosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos se glucosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes. Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan la función de la proteína (Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) y la interacción intramolecular entre las porciones de la glucoproteína, lo cual puede afectar la conformación y la superficie tridimensional de la glucoproteína (Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glucoproteína determinada a ciertas moléculas sobre la base de estructuras de reconocimiento específicas. También se informó que la glucosilación de anticuerpos afecta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisectriz, tienen

actividad de ADCC mejorada (Umana et al., 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180).

Por lo general, la glucosilación de anticuerpos se liga a N o se liga a O. Ligado a N se refiere a la unión de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por ello, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídica en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

De manera conveniente, la adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas antes descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también se puede obtener mediante la adición de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original o mediante la sustitución con estos (para sitios de glucosilación ligados a O).

El patrón de glucosilación de anticuerpos también se puede alterar sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glucosilación depende, en gran medida, de la célula huésped que se usa para expresar el anticuerpo. Debido a que el tipo de célula que se usa para la expresión de glucoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como posible producto terapéutico, muy pocas veces es la célula natural, pueden verse variaciones en el patrón de glucosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070).

Además de la elección de células huésped, los factores que afectan la glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de medios, densidad del cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y factores similares. Se propusieron varios métodos para alterar el patrón de glucosilación obtenido en un organismo huésped particular, que incluye introducir o sobreexpresar ciertas enzimas que participan en la producción de oligosacáridos (patentes estadounidenses N.º 5.047.335, 5.510.261 y 5.278.299). La glucosilación, o ciertos tipos de glucosilación, se puede eliminar enzimáticamente de la glucoproteína, por ejemplo, usando endoglicosidasa H (Endo H), N-glicosidasa F, endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa F3. Además, la célula huésped recombinante se puede modificar por ingeniería genética para que sea

funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector, pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo de origen. El ligando efector al cual se le altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque también se describe en mayor detalle en las patentes estadounidenses N.º 5.624.821 y 5.648.260.

En otro caso, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 por un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo presente una alteración de la unión a C1q y/o una reducción o eliminación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque también se describe en mayor detalle en la patente estadounidense N.º 6.194.551.

En otro ejemplo, se alteran uno o más residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 para así alterar la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque también se describe en la publicación de PCT WO 94/29351.

Aun en otro ejemplo, se modifica la región Fc para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o de aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque también se describe en la publicación de PCT WO 00/42072. Además, se mapearon los sitios de unión en IgG1 humano para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn, y se describieron variantes con unión mejorada (véase Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001)). Se demostró que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcγRIII. Además, se demostró que las siguientes combinaciones de mutantes mejoran la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

Aun en otro ejemplo, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede obtener un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece

de glucosilación). La glucosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo al antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glucosilación en la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de marco de región variable, para así eliminar la glucosilación en ese sitio. La aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo al antígeno. Este enfoque se describe en mayor detalle en las patentes estadounidenses N.º 5.714.350 y 6.350.861.

De manera adicional o alternativa, se puede obtener un anticuerpo que tenga un tipo de glucosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga una menor cantidad de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga más estructuras GlcNac bisectrices. Se demostró que dichos patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Las modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula huésped que tenga una maquinaria de glucosilación alterada. Las células que tienen una maquinaria de glucosilación alterada se describieron en el arte y se pueden usar como células huésped para expresar en ellas anticuerpos recombinantes de la descripción, para así producir un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en los carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8^{-/-} se crearon mediante la alteración dirigida del gen FUT8 en las células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véase la publicación de patente estadounidense N.º 2004-0110704, y Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng* 87:614-22 (2004)). En otro ejemplo, la publicación de patente europea N.º EP1.176.195 describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiban hipofucosilación mediante la reducción o eliminación de la enzima relacionada con el enlace 1,6 alfa. EP1.176.195 también describe líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para agregar fucosa a N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo, o que no tienen actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con una menor

defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas y otras técnicas son conocidas en el arte.

Otros métodos de modificación posterior a la traducción incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en el arte, que incluyen, entre otras, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Se pueden usar modificaciones, por ejemplo, para la unión de etiquetas para el inmunoensayo.

Anticuerpos anti Notch-1 con región constante modificada

En algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológica o parcialmente inerte, es decir, no desencadena la lisis mediada por el complemento, no estimula la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) ni activa la microglia; o tiene menor actividad (en comparación con el anticuerpo no modificado) de uno o más de los siguientes: desencadenar la lisis mediada por el complemento, estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o activar la microglia. Se pueden usar diferentes modificaciones de la región constante para lograr un nivel óptimo y/o la combinación de funciones efectoras. Véase, por ejemplo, Morgan et al., *Immunology* 86:319-324 (1995); Lund et al., *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969 (1996); Idusogie et al., *J. Immunology* 164:4178-4184 (2000); Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); y Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). En algunas formas de realización, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; solicitud PCT N.º PCT/GB99/01441; y/o patente del Reino Unido N.º 9809951.8. En otras formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante IgG2 de la cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con respecto a la secuencia IgG2 de tipo silvestre). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624. Aun en otras formas de realización, la región constante es aglucosilada para la glucosilación ligada a N. En algunas formas de realización, la región constante es aglucosilada para la glucosilación ligada a N mediante la mutación del residuo de aminoácido glucosilado o residuos laterales que son parte de la secuencia de reconocimiento de glucosilación N en la región constante. Por ejemplo, el sitio de glucosilación N N297 se puede mutar a A, Q, K o H. Véase, Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); y Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). En algunas formas de realización, la región constante es aglucosilada para la glucosilación ligada a N. La región constante puede estar

aglicosilada para la glucosilación ligada a N de manera enzimática (por ejemplo, retirando carbohidratos mediante la enzima PNGasa) o mediante la expresión en una célula huésped deficiente de glucosilación.

Por lo general, las modificaciones en la región Fc se pueden usar para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la vida media del suero, la fijación del complemento, la unión del receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígenos. Además, un anticuerpo de la descripción se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir una o más porciones químicas al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su patrón de glucosilación, para alterar, una vez más, una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada uno de estos aspectos se describe en mayor detalle más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En un caso, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que se altere, por ejemplo, aumente o disminuya, la cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra. Este enfoque también se describe en la patente estadounidense N.º 5.677.425. La cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamble de las cadenas pesadas y livianas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otro caso, se muta la región bisagra Fc de un anticuerpo para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra Fc, de manera que el anticuerpo tenga una unión deficiente de proteína A de *Staphylococcyi* (SpA) con respecto a la unión de SpA al dominio bisagra Fc natural. Este enfoque también se describe en mayor detalle en la patente estadounidense N.º 6.165.745.

En otro caso, se modifica el anticuerpo para aumentar su vida media biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, descritas en la patente estadounidense N.º 6.277.375. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, se puede alterar el anticuerpo dentro de la región CH1 o CL de manera que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de IgG, como se describe en las patentes estadounidenses N.º 5.869.046 y 6.121.022.

Aun en otros casos, la región Fc se altera mediante el reemplazo de, al menos, un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente para alterar las

capacidad de unir fucosa a los carbohidratos ligados a Asn(297), lo cual también da como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa línea celular (véase también Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 (2002)). La publicación PCT WO 99/54342 describe líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar glicosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética exhiban más estructuras GlcNac bisectrices que den como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., *Nat. Biotech.* 17:176-180 (1999)). De manera alternativa, los residuos de fucosa del anticuerpo se pueden escindir usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa retira los residuos de fucosilo de los anticuerpos (Tarentino et al., (1975) *Biochem.* 14:5516-23 (1975)).

Otra modificación de los anticuerpos de la presente, que está contemplada por la descripción es la PEGilación. Un anticuerpo que se puede pegar, por ejemplo, para aumentar la vida media biológica (por ejemplo, suero) del anticuerpo. Por lo general, para pegar un anticuerpo, se hacen reaccionar el anticuerpo o un fragmento de este con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de este. Con frecuencia, la pegilación se realiza mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Como se usa en la presente, la expresión "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se usaron para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C₁ a C₁₀) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertos casos, el anticuerpo que se pegará es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegar proteínas se conocen en el arte y se pueden aplicar a los anticuerpos de la presente descripción. Véanse, por ejemplo, las patentes europeas N.º EP 0154316B1 y EP 0401384B1.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se modificaron como se describe en la publicación PCT N.º WO 99/58572. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula objetivo, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la totalidad o a una parte de un dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos pueden unirse a la molécula objetivo sin desencadenar, en gran medida, la lisis dependiente del complemento o la destrucción celular del objetivo. En algunas formas de realización, el dominio efector es capaz de

unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Por lo general, estos se basan en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios de C_H2 de la cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para usar en la terapia crónica con anticuerpos, a fin de evitar reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia convencional con anticuerpos.

Proteína de fusión

La invención también abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos o polipéptidos de la presente invención. En una forma de realización, se provee un polipéptido de fusión que comprende, al menos, 10 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena liviana y/o, al menos, 10 aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos de la presente invención. En otras formas de realización, se provee un polipéptido de fusión que comprende al menos alrededor de 10, al menos alrededor de 15, al menos alrededor de 20, al menos alrededor de 25 o al menos alrededor de 30 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena liviana y/o al menos alrededor de 10, al menos alrededor de 15, al menos alrededor de 20, al menos alrededor de 25 o al menos alrededor de 30 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena pesada. En otra forma de realización, el polipéptido de fusión comprende una región variable de la cadena liviana y/o una región variable de la cadena pesada de los anticuerpos de la presente invención. En otra forma de realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR de los anticuerpos de la presente invención. A los fines de la presente invención, una proteína de fusión contiene uno o más anticuerpos y otra secuencia de aminoácidos a la que no se une en la molécula natural, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Los ejemplos de secuencias heterólogas incluyen, entre otros, una "etiqueta", tal como una etiqueta FLAG o 6His.

Se puede crear un polipéptido de fusión mediante los métodos conocidos en el arte, por ejemplo, mediante síntesis o de forma recombinante.

Molécula biespecíficas

Un anticuerpo de la descripción o las porciones de unión al antígeno de este se pueden derivatizar o unir a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) a fin de generar una

molécula biespecífica que se una, al menos, a dos sitios de unión o moléculas objetivo diferentes. De hecho, el anticuerpo de la descripción se puede derivatizar o unir a más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unan a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas objetivo; como se usa en la presente, la expresión "molécula biespecífica" también pretende abarcar dichas moléculas biespecíficas. Para crear una molécula biespecífica de la descripción, se puede unir funcionalmente un anticuerpo de la descripción (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, a fin de obtener una molécula biespecífica.

Polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti Notch-1

La invención también provee polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y péptidos de la invención, y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

En un aspecto, la invención provee composiciones, tal como una composición farmacéutica, que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas formas de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención. En otra forma de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención.

En otro aspecto, la invención provee un método para obtener cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente.

La presente invención también abarca polinucleótidos complementarios de cualquiera de dichas secuencias. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómicas, cADN o sintéticas) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de HnRNA, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de manera individual, y moléculas de mARN que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden estar presentes, aunque no es necesario, en un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede estar unido, aunque no es necesario, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia natural (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una porción de este) o pueden

comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones y/o inserciones, de manera que no disminuya la inmunorreactividad del polipéptido codificado, con respecto a una molécula inmunorreactiva natural. Por lo general, el efecto en la inmunorreactividad del polipéptido codificado se puede evaluar como se describe en la presente. Preferentemente, las variantes exhiben al menos alrededor de 70 % de identidad, con mayor preferencia, al menos alrededor de 80 % de identidad, aun con mayor preferencia, al menos alrededor de 90 % de identidad y, con máxima preferencia, al menos alrededor de 95 % de identidad con una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo natural o una porción de este.

Se considera que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es igual cuando se alinea para tener una máxima correspondencia, como se describe más adelante. Por lo general, las comparaciones entre dos secuencias se realizan comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Como se usa en la presente, una "ventana de comparación" se refiere a un segmento que tiene al menos alrededor de 20 posiciones contiguas, por lo general, de 30 a alrededor de 75 o de 40 a alrededor de 50, en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia que tenga la misma cantidad de posiciones contiguas después de alinear óptimamente las dos secuencias.

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos, en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) de 20 % o menos, por lo general, de 5 a 15 % o de 10 a 12 %, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones ni eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Para calcular el porcentaje, se debe determinar la cantidad de posiciones en las que ocurren los residuos de aminoácidos o bases de ácidos nucleicos idénticas en ambas secuencias para obtener la cantidad de posiciones coincidentes, dividir la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicar los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

De manera adicional o alternativa, las variantes pueden ser sustancialmente

homólogas de un gen natural o una porción o complemento de este. Las variantes de polinucleótidos pueden hibridarse en condiciones moderadamente rigurosas a una secuencia de ADN natural que codifica un anticuerpo natural (o una secuencia complementaria).

"Condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen el lavado previo en una solución de 5 X SSC, 0,5 % de SDS, 1,0 mM de EDTA (pH 8,0); hibridación a 50 °C-65 °C, 5 X SSC, durante la noche; seguido de lavado dos veces a 65 °C durante 20 minutos, cada uno de 2 x, 0,5 x y 0,2 x SSC que contiene 0,1 % de SDS.

Como se usa en la presente, "condiciones muy rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) usan baja intensidad iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/0,1 % de dodecilsulfato de sodio a 50 °C; (2) usan durante la hibridación un agente de desnaturalización, tal como formamida, por ejemplo, 50 (v/v) de formamida con 0,1 % de albúmina de suero bovino/0,1 % de Ficoll/0,1 % de polivinilpirrolidona/50 mM de amortiguador de fosfato de sodio a pH 6,5 con 750 mM de cloruro de sodio, 75 mM de citrato de sodio a 42 °C; o (3) usan 50 % de formamida, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonido (50 µg/ml), 0,1 % de SDS y 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50 % de formamida a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C. El experto en el arte sabrá cómo ajustar la temperatura, la intensidad iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda, y factores similares.

Los expertos en el arte tendrán en cuenta que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido descrito en la presente. Algunos de estos polinucleótidos tienen homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen natural. Sin embargo, la presente invención contempla específicamente polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso del codón. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos provistas en la presente se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El mRNA y la proteína resultantes pueden tener, aunque no es necesario, una estructura o función alteradas.

Los alelos se pueden identificar mediante técnicas estándares (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias en base de datos).

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden obtener mediante síntesis química, métodos recombinantes o PCR.

Para preparar polinucleótidos mediante métodos recombinantes, se puede insertar un polinucleótido que comprende una secuencia deseada en un vector adecuado y, a su vez, el vector se puede introducir en una célula huésped adecuada para la replicación y amplificación, como se analiza en la presente. Se pueden insertar polinucleótidos en células huésped por medio de métodos conocidos en el arte. Las células se transforman mediante la introducción de un polinucleótido exógeno por absorción directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno se puede mantener dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de esta manera se puede aislar de la célula huésped mediante métodos conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989).

De manera alternativa, PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR es muy conocida en el arte y se describe en las patentes estadounidenses N.º 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como en PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkhäuser Press, Boston (1994).

El ARN se puede obtener mediante el uso del ADN aislado en un vector adecuado y su inserción en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN se puede aislar mediante métodos conocidos por los expertos en el arte, como se indica, por ejemplo, en Sambrook et al., (1989), *supra*.

Los vectores de clonación adecuados se pueden construir de acuerdo con técnicas estándares o se pueden seleccionar de una gran cantidad de vectores de clonación disponibles en el arte. Si bien el vector de clonación seleccionado puede variar según la célula huésped que se pretende usar, por lo general, los vectores de clonación útiles tienen la capacidad de autorreplicarse, pueden tener un único objetivo para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden tener genes para un marcador que se puede usar para seleccionar clones que contengan el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN del fago y vectores transportadores, tales como pSA3

y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles de vendedores comerciales, tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Por lo general, los vectores de expresión son constructos de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se sobreentiende que un vector de expresión debe poder replicarse en las células huésped como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, entre otros, plásmidos, vectores virales, que incluyen adenovirus, virus asociada a adeno, retrovirus, cósmidos y vectores de expresión descritos en la publicación PCT N.º WO 87/04462. Por lo general, los componentes de los vectores incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, la traducción), por lo general, también se requieren uno o más elementos de control de la traducción, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de iniciación de la traducción y codones de detención.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés se pueden introducir en la célula huésped mediante varios medios adecuados, que incluyen electroporación, transfección mediante cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso, tal como un virus vaccinia). Con frecuencia, la elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá de las características de la célula huésped.

La invención también provee células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Se puede usar cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogo a fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, el polipéptido o la proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamíferos incluyen, entre otras, células COS, HeLa y CHO. Véase también la publicación PCT N.º WO 87/04462. Las células huésped adecuadas que no son de mamíferos incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levadura (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe* o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los cADN a un nivel de alrededor de 5 veces mayor, con mayor preferencia, 10 veces mayor, aun con mayor preferencia, 20 veces mayor que el de la proteína o anticuerpo endógeno de interés correspondiente, si estuviesen presentes, en las células huésped. El análisis de células huésped para determinar una unión específica a Notch-1 o a un dominio Notch-1 se realiza mediante inmunoensayo o FACS. Se

puede identificar una célula que sobreexpresa el anticuerpo o la proteína de interés.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción provee una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo monoclonal o una combinación de anticuerpos monoclonales o porciones de unión al antígeno de estos, de la presente descripción, formulada junto con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Dichas composiciones pueden incluir un anticuerpo o una combinación de anticuerpos (por ejemplo, dos o más anticuerpos diferentes) o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la descripción. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la descripción puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a diferentes epítomos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción también se pueden administrar en una terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti Notch1 de la presente descripción, combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en la terapia de combinación se describen en mayor detalle más adelante en la sección sobre los usos de los anticuerpos de la descripción.

Como se usa en la presente, "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes demoradores isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Por lo general, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Según la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, la porción de unión al antígeno de este, el inmunoconjugado o la molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente descripción pueden estar presentes en forma neutra (incluso formas iónicas zwitteriónicas) o como especies con carga positiva o negativa. En algunos casos, los anticuerpos pueden formar un complejo con un contraión a fin de obtener una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Por ello, los compuestos farmacéuticos de la descripción

pueden incluir una o más sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

Una "sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto de origen (por ejemplo, anticuerpo) y no produce efectos toxicológicos indeseados (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* **66**:1-19). Por ejemplo, la expresión "sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraiones, en donde los contraiones derivan de bases y ácidos orgánicos e inorgánicos aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas que derivan de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición básica incluyen aquellas que derivan de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Además, las bases inorgánicas aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen iones metálicos. Los iones metálicos incluyen, entre otros, sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos adecuadas y otros iones metálicos fisiológicamente aceptables. Las sales que derivan de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobalto, níquel, molibdeno, vanadio, manganeso, cromo, selenio, estaño, cobre, sales férricas, ferrosas, de litio, magnesio, mangánicas, manganosas, potasio, rubidio, sodio y zinc, y sus valencias habituales.

Las sales de adición ácida aceptables desde el punto de vista farmacéutico de los anticuerpos de la presente descripción se pueden preparar de los siguientes ácidos, que incluyen, entre otros, ácido fórmico, acético, acetamidobenzoico, adípico, ascórbico, bórico, propiónico, benzoico, canfórico, carbónico, ciclámico, dehidrocólico, malónico, edético, etilsulfúrico, fendizoico, metafosfórico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, tánico, cítrico, nítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fólico, fumárico, propiónico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, lisina, isocítrico, trifluoroacético, pamoico, propiónico, antranílico, mesílico, orótico, oxálico, oxalacético, oleico, esteárico,

salicílico, aminosalicílico, silicato, p-hidroxibenzoico, nicotínico, fenilacético, mandélico, embónico, sulfónico, metansulfónico, fosfórico, fosfónico, etansulfónico, etandisulfónico, amonio, bencensulfónico, pantoténico, naftalensulfónico, toluensulfónico, 2-hidroxietansulfónico, sulfanílico, sulfúrico, nítrico, nitroso, monometiléter del ácido sulfúrico, ciclohexilaminosulfónico, β -hidroxibutírico, glicina, glicilglicina, glutámico, cacodilato, diaminohexanoico, canforsulfónico, glucónico, tiociánico, oxoglutámico, piridoxal 5-fosfato, clorofenoxiacético, undecanoico, N-acetil-L-aspartico, galactárico y galacturónico.

Las bases orgánicas aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen trimetilamina, dietilamina, N, N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dibencilamina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), procaína, aminas cíclicas, cationes de amonio cuaternario, arginina, betaína, cafeína, clemizol, 2-etilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etandiamina, butilamina, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, etilglucamina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, imidazol, isopropilamina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piridina, piridoxina, neodímio, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, tripropilamina, trietanolamina, trometamina, metilamina, taurina, colato, 6-amino-2-metil-2-heptanol, 2-amino-2-metil-1,3-propandiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácidos alifáticos monocarboxílicos y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos por fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, estroncio, tricina, hidrazina, fenilciclohexilamina, ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico, bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano, ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetansulfónico, ácido 1,4-piperazindietansulfónico, ácido 3-morfolino-2-hidroxi-propansulfónico, 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano, ácido 4-morfolinpropansulfónico, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etansulfónico, ácido 2-[(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]etansulfónico, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetansulfónico, ácido 4-(N-morfolino)butansulfónico, ácido 3-(N,N-bis[2-hidroxietil]amino)-2-hidroxi-propansulfónico, ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propansulfónico, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-(2-hidroxi-propansulfónico), ácido piperazin-1,4-bis(2-hidroxi-propansulfónico) dihidrato, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinpropansulfónico, N,N-bis(2-hidroxietil)glicina, ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(4-butansulfónico), ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropansulfónico, ácido N-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutansulfónico, ácido N-(1,1-dimetil-2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxi-propansulfónico, ácido 2-

(ciclohexilamino)etansulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propansulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propansulfónico, ácido *N*-(2-acetamido)iminodiacético, ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butansulfónico, *N*-[tris(hidroximetil)metil]glicina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propandiol y trometamol.

Una composición farmacéutica de la descripción también puede incluir un antioxidante aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los ejemplos de antioxidantes aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulgentes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización, *supra*, y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que demoran la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de dichos medios y agentes para sustancias activas desde el punto de vista farmacéutico se conoce en el arte. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente

convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de estos en las composiciones farmacéuticas de la descripción. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

Por lo general, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración farmacológica. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y usando tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede provocar al incluir en la composición un agente que demora la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones estériles inyectables se pueden preparar mediante la incorporación de la cantidad necesaria de compuesto activo en un solvente adecuado con un ingrediente o una combinación de ingredientes antes enumerados, según sea necesario, y la posterior esterilización microfiltrada. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los que se enumeraron anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos de preparación incluyen, entre otros, secado al vacío y secado por congelación (liofilización), que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de estos.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará según el sujeto tratado y el modo de administración particular. Por lo general, la cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única es la cantidad de composición que produce un efecto terapéutico. Por lo general, de un total de 100 %, esta cantidad varía de alrededor de 0,01 % a alrededor de 99 % de ingrediente activo, preferentemente, de alrededor de 0,1 % a alrededor de 70 %, con máxima preferencia, de alrededor de 1 % a alrededor de 30 %

de ingrediente activo en combinación con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

Los regímenes de dosificación se ajustan para brindar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, varias dosis divididas durante un período de tiempo, o se puede reducir o aumentar la dosis de manera proporcional, según las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosis para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. Como se usa en la presente, la forma de unidad de dosis se refiere a unidades físicamente diferenciadas útiles como formas de dosificación unitarias para los sujetos que se tratarán; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidad de dosis de la descripción está determinada por (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea lograr y (b) las limitaciones inherentes en el arte de formar dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos, y depende directamente de estos factores.

Para la administración del anticuerpo, la dosis varía de alrededor de 0,0001 a 100 mg/kg y, con mayor frecuencia, de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o pueden estar dentro del rango de 1 a 10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez por mes, una vez cada tres meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación para un anticuerpo anti Notch-1 o una porción de unión al antígeno de este de la descripción incluyen, por ejemplo, 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa; para el anticuerpo que se administra se usa uno de los siguientes regímenes de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez y, luego, 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran de manera simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los rangos indicados. Por lo general, el anticuerpo se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre

las dosis unitarias pueden ser, por ejemplo, semanal, mensual, cada tres meses o anual. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique al medir los niveles de anticuerpos en sangre para el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, se ajusta la dosis para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de alrededor de 1 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ y, en algunos métodos, de alrededor de 25 a 300 $\mu\text{g/ml}$.

Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían según la vida media del anticuerpo en el paciente. Por lo general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más prolongada, seguido por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar según si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja en intervalos relativamente frecuentes durante un período prolongado. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento de por vida. En las aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosis relativamente alta en intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o finaliza el avance de la enfermedad y, preferentemente, hasta que el paciente muestra una mejora parcial o total de los síntomas de la enfermedad. A continuación, el paciente puede recibir un régimen profiláctico.

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden ser variados, a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos, lo que incluye la actividad de las composiciones particulares usadas de la presente descripción, o del éster, la sal o la amida de estas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se utilice, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud en general y los antecedentes médicos del paciente que esté recibiendo el tratamiento, y factores similares ampliamente conocidos en las artes médicas.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti Notch de la descripción da como resultado, preferentemente, una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, una disminución de la frecuencia y duración de los

períodos libres de síntomas de la enfermedad o una prevención de la disfunción o discapacidad debido al agobio por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de los tumores Notch-1 positivos, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe, preferentemente, el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en, al menos, alrededor de 20 %, con mayor preferencia, en, al menos, alrededor de 40 %, aun con mayor preferencia en, al menos, alrededor de 60 % y aun con mayor preferencia en, al menos, alrededor de 80 % en relación con sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema de modelos animales predictivo de la eficacia en tumores humanos. De manera alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir; dicha inhibición *in vitro* mediante ensayos es conocida por el experto en el arte. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en el arte sería capaz de determinar tales cantidades en función de ciertos factores, como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particulares seleccionadas.

Una composición de la presente descripción puede administrarse a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en el arte. Como podrá apreciar el experto en el arte, la vía y/o el modo de administración variarán en función de los resultados deseados. Las vías de administración para los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de estos incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral", como se usa en la presente, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluye, entre otros, administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e inyección e infusión intraesternal.

De manera alternativa, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de este de la descripción puede administrarse por vía no-parenteral, como una vía de administración tópica, epidérmica o por mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, como una formulación de liberación controlada,

lo que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en el arte. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Usos y métodos de la descripción

Los anticuerpos, en particular los anticuerpos humanos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente descripción tienen varias utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* que incluyen el diagnóstico y el tratamiento de trastornos mediados por Notch-1. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar varios trastornos. Como se usa en la presente, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen a todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por la actividad de Notch-1. Los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos con un trastorno asociado con la activación o expresión anormal de Notch-1. Cuando los anticuerpos de Notch-1 se administran junto con otro agente, ambos pueden administrarse en cualquier orden o de manera simultánea.

Debido a la unión específica de los anticuerpos de la descripción de Notch-1, los anticuerpos de la descripción se pueden usar para detectar específicamente la expresión de Notch-1 en la superficie de las células y, además, se pueden usar para purificar Notch-1 mediante la purificación por inmunoafinidad.

Asimismo, los anticuerpos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente descripción se pueden usar para tratar a un sujeto con crecimiento celular anormal, por ejemplo, un cáncer. En una forma de realización particular, el cáncer es LLA-T. En una forma de realización particular, el cáncer es cáncer de mama.

Otro tipo de crecimiento celular anormal que puede tratarse mediante los anticuerpos de la invención incluye, por ejemplo, mesotelioma, un tumor del sistema nervioso central (SNC) hepatobiliar primario o secundario (conducto hepático y biliar),

un tumor cerebral primario o secundario, cáncer de pulmón (NSCLC y SCLC), cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o del cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovarios, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de testículo, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del SNC, linfoma primario del SNC, linfoma no hodgkin, tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de la vesícula biliar, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma o una combinación de uno o más de los tipos de cáncer anteriores.

Las vías de administración adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) o las porciones de unión al antígeno de estas de la descripción *in vivo* e *in vitro* son muy conocidas en el arte y las pueden seleccionar los expertos en el arte. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse por inyección (*por ejemplo*, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o la formulación de la composición de anticuerpos.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos humanos anti-Notch-1 o las porciones de unión a los antígenos de estos de la descripción pueden coadministrarse con uno o más de los agentes terapéuticos, *por ejemplo*, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo se puede unir al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar de manera separada del agente. En el último caso (administración por separado), el anticuerpo se puede administrar antes, después o de manera concurrente con el agente o se puede coadministrar con otras terapias conocidas, *por ejemplo*, una terapia contra el cáncer, *por ejemplo*, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos,

como doxorrubicina (adriamycin), cisplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucil y ciclofosfamida hidroximetilurea que, por sí solos, son eficaces únicamente a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. La cisplatina puede administrarse de manera intravenosa a 100 mg/dosis una vez cada cuatro semanas, y la adriamicina se administra de manera intravenosa como una dosis de 60 a 75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de anticuerpos humanos anti-Notch-1, o los fragmentos de unión a los antígenos de estos, de la presente descripción con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes contra el cáncer que funcionan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico en las células. Dicha coadministración puede solucionar problemas debido al desarrollo de resistencia a los fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales, que las tornaría no reactivas con el anticuerpo.

Kits

También dentro del alcance de la presente descripción, se encuentran los kits que comprenden las composiciones de la descripción (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit también puede contener uno o más reactivos, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales o porciones de unión a los antígenos de estos de la descripción (por ejemplo, un anticuerpo humano con una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno Notch-1 distinto del primer anticuerpo humano).

En consecuencia, a los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la descripción se les puede administrar también (antes, de manera simultánea con la administración de un anticuerpo humano de la descripción o después de esta) otro agente terapéutico, como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

La presente descripción también se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes. El contenido de todas las figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas en la presente solicitud se incorporan expresamente a la presente como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y expresión del inmunogén Notch1

Generación de constructos de expresión del inmunogén Notch1

Los constructos del inmunogén se generaron mediante PCR múltiplex (Figura 1) para la generación de anticuerpos monoclonales (mAb). Como se ilustra en la Figura 1, el cADN del inmunogén Notch1 se sintetizó mediante PCR de superposición múltiple usando el clon de cADN de longitud completa de Notch1 como molde (OriGene, Cat. N.º TC308883, Rockville, MD) y el sistema de reactivo PCR de alta fidelidad de acuerdo con el protocolo del fabricante (Roche, Indianapolis, IN). El cADN del inmunogén Notch1 recombinante, que contenía el péptido líder del terminal N, repeticiones de tipo EGF 35-36, NRR, (incluso los dominios Lin A, B y C, y el dominio HD) y una pequeña porción de la secuencia intracelular, se clonó en un vector de proteína de fusión Fc con inmunogén Notch1 fusionado con el terminal N de la secuencia Fc. El plásmido del inmunogén Notch1, denominado N1-NRR-TM(-), contiene el inserto de cADN que se muestra en la secuencia 1 en la Figura 11, (SEQ ID NO:1), que codifica la proteína del inmunogén que se muestra en la secuencia 2 en la Figura 11 (SEQ ID NO:2).

Se construyó un plásmido similar en paralelo, como se muestra en la Figura 2, que contiene la misma secuencia que N1-NRR-TM(-), excepto que la secuencia de transmembrana (TM) (los últimos 24 residuos de aminoácidos en la Secuencia 4) se usó para reemplazar la secuencia intracelular (los últimos 44 residuos de aminoácidos en la Secuencia 2) de N1-NRR-TM(-). El cADN del inmunogén Notch1 amplificado por PCR se clonó en pcDNA3.1D/V5-His (Invitrogen). El plásmido se denominó N1-NRR-TM(+). La secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia de aminoácidos de N1-NRR-TM(+) se muestran en las secuencias 3 (SEQ ID NO:3) y 4 (SEQ ID NO:4) en la Figura 12.

Expresión y purificación de la proteína del inmunogén Notch1

N1-NRR-TM(-) se expresó en células 293-F de Freestyle™ (Invitrogen, Inc., Calsbad, CA) mediante transfección transitoria usando reactivo Freestyle™ Max (Invitrogen) y el protocolo del fabricante, verificado por análisis Western blot. En síntesis, se sembraron 1×10^7 células en un recipiente agitador de cultivo tisular que contenía 30 mililitros (ml) de medio de crecimiento de células 293-F (Invitrogen). La proteína secretada se analizó tomando una alícuota de 0,5 ml de un medio condicionado cada 24 horas desde el día 2 hasta el día 7 después de la transfección. Se combinaron 20 microlitros (ul) de medio condicionado y amortiguador de carga de muestra de proteínas 2 x (BioRad, Hercules, CA) y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras se separaron mediante electroforesis en un gradiente de 4-12

% de SDS-PAGE (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron desde un gel hasta una membrana de transferencia mediante un dispositivo de transferencia en seco (Invitrogen); luego, la membrana se bloqueó con 5 % de leche descremada en polvo en PBST (PBS con 0,05 % de Tween-20) durante 1 hora. La detección de las proteínas de fusión N1-MRRHD-TM(-)/Fc se realizó mediante incubación con anticuerpo conjugado con HRP, específico de γ Fc humano (Bethyl Lab. Inc. Montgomery, TX). La membrana se lavó tres veces en PBST antes de desarrollarse con sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, Rockford, IL). El estudio del transcurso de tiempo de la expresión de la proteína mostró que el medio condicionado de 5-6 días de cultivo contiene la mayor parte de la proteína de fusión N1-NRR-TM(-)/Fc segregada. Por lo tanto, la expresión de la proteína N1-NRR-TM(-)/Fc aumentó proporcionalmente a 10 litros del volumen del cultivo, y la proteína se purificó mediante columna de afinidad a la proteína G (Invitrogen).

Establecimiento de líneas celulares que expresan inmunogén Notch1

N1-NRR-TM(+) se transfectó de manera estable en una línea celular de ratón, L-929 (ATCC, CCL-1, Manassas, VA), expresada como una proteína sujeta a la membrana de la superficie celular. La línea celular estable se determinó mediante transfección con LipoFectamine™ 2000 (Invitrogen), y las células se seleccionaron de 1 mg/ml de neomicina (G418) durante alrededor de 9-15 días hasta que cada una de las colonias fue visible a simple vista, y se recogieron para el crecimiento clonal. El nivel de expresión de la proteína N1-NRR-TM(+)/V5 se evaluó mediante Western blot con extracto de proteína obtenido de cada clon de transfección estable. Más específicamente, se retiraron de los recipientes de cultivo las células de cada clon, se enjuagaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se sometieron al análisis Western blot descrito anteriormente. La proteína se detectó mediante anticuerpo anti-V5 conjugado con HRP (Invitrogen). Los clones celulares que expresaron el nivel más alto de proteína N1-NRR-TM(+) se seleccionaron para el uso de inmunización y ensayo celular de unión al anticuerpo.

Ejemplo 2: Generación de mAb Notch1

Inmunización y clonación de hibridomas

Se inmunizaron ratones Balb/c con inmunogén Notch1 humano, N1-NRR-TM(-), y un largo protocolo de inmunización. La primera inmunización se realizó mediante inyección subcutánea (sc) con 20 microgramos (μ g) del antígeno

mezclado en emulsión de adyuvante completo de Freund (CFA), seguido de 3 inyecciones sc dos veces por semana; en cada una de ellas se suministraron 20 µg de antígeno mezclado en emulsión de adyuvante incompleto de Freund (IFA). El suero se tomó una semana después de la cuarta inyección de antígeno para verificar la titulación de los anticuerpos mediante ELISA. El ratón con titulación de alta respuesta se sometió a eutanasia, y se extrajo el bazo quirúrgicamente para la clonación de hibridomas.

Se preparó una única suspensión celular de esplenocitos haciendo pasar el bazo por la fuerza a través de una malla de acero inoxidable de 100 micrones, luego, a través de un filtro celular, y se lavó dos veces en 30 ml de RPMI. Los esplenocitos se mezclaron con células Sp2/0-Ag14 (Sigma, St. Louis, MO) en una relación de 3 a 1, y se facilitó la fusión celular mediante la adición de 50 % de PEG-1500 y agitación suave. La mezcla de células se precipitó mediante centrifugación, y se lavó suavemente con RPMI, seguido de la incubación en un medio RPMI-1640 con 20 % de suero fetal de ternero (FCS) a 37 °C durante 30 minutos. Las células se suspendieron en RPMI-1640 que contenía 20 % de FCS, HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) estándar, 25 % de medio condicionado de bazo, 2 mM de glutamato y 100 µg/ml de Pen-Strip (Invitrogen, Calsbad, CA), se distribuyeron en placas de 96 cavidades y se cultivaron en un incubador a 37 °C/ CO₂ al 5 % durante 8 a 20 días para permitir que se establezcan los clones de hibridomas resistentes a HAT. Los medios condicionados de cada clon de hibridoma se sometieron a ensayo ELISA.

Ensayo ELISA de anticuerpos monoclonales (mAb)

Se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con placas de 96 cavidades Nunc™ MaxiSorp (ThermoFisher Scientific, Rochester, NY), que se prepararon en dos grupos: placas de pruebas positivas recubiertas durante la noche con 100 ng de proteína N1-NRR-TM(-)/Fc en cada cavidad y placas de control negativo recubiertas con 100 ng de proteína Fc humana. Se analizaron los medios condicionados de los clones de hibridomas para determinar su capacidad de unirse a la proteína N1-NRR-TM(-)/Fc. Se agregaron 100 microlitros de cada sobrenadante de hibridoma a las placas recubiertas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las cavidades se lavaron tres veces con PBST (1 x PBS con 0,05 % de Tween-20). Se agregó peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con anticuerpo de Fc anti-ratón de cabra para detectar los mAb unidos al antígeno. Se retiró el exceso de HRP lavando tres veces con PBST, 200 µl por cavidad para cada lavado. Luego, se

agregó solución de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) como sustrato para el desarrollo del color de HRP. Se detuvo la reacción, y las placas se barrieron mediante un lector de placa a 405 nm. Las cavidades positivas se cribaron nuevamente con placas recubiertas con proteínas N1-NRR-TM(-)/Fc y se sometieron a cribado inverso con placas recubiertas con Fc humana de la misma manera que se describió anteriormente. Los mAb de hibridomas que solo se unían a la proteína N1-NRR-TM(-)/Fc pero no a la Fc humana eran verdaderos anticuerpos de unión a Notch1, que se seleccionaron para someterlos a cribado funcional.

Ejemplo 3: Identificación y caracterización de mAb antagonista de Notch1

Establecimiento de líneas celulares del ensayo indicador de luciferasa

El ensayo indicador de luciferasa se usaba habitualmente para evaluar la actividad de transcripción y señalización mediada por el receptor Notch1 en varios entornos (Weng, A.P., et. al, Science, 2004, 9265-9273; Osipo et al., Oncogene, 2008, 27(37):5019-5032). A fin de evaluar la activación de Notch1 inducida por ligandos y la inhibición de mAb, se desarrollaron líneas celulares como herramientas para mejorar la señalización de Notch. Se sabe que la forma activa del receptor Notch que consistía en un dominio intracelular se transloca al núcleo y forma un complejo con el factor de unión 1 a CSL [que recibe su nombre de CBF1, Su(H) y LAG-1], el cual se une a la secuencia nuclear denominada motivo de unión a CSL en una región del promotor génico y, de esta manera, se activa la transcripción génica corriente abajo (Bray, 2006). En función de esos descubrimientos, se generó el plásmido indicador de luciferasa mediada por Notch1. En síntesis, se introdujeron concatémeros de ocho motivos de unión a CSL, como describe Tun et al. (Tun et al., Nucleic Acids Res. 1994m 22(6):965-971) en el sitio de clonación múltiple de pTA-Luc (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Se agregó un marcador de selección de higromicina (véase el párrafo siguiente) al gen de luciferasa corriente abajo. Esto produjo el plásmido indicador de luciferasa, CSLuc.

El constructo de la expresión de Notch1 de longitud completa se obtuvo de OriGene (Rockville, MD) y se verificó mediante la secuenciación idéntica a NM_017617.2 (número de acceso a NCBI/GenBank). Se sintetizó por PCR un marcador de selección de higromicina con el promotor SV40 de pcDNA3.1/higromicina (Invitrogen) y se conectó con una secuencia de señalización poli-A 3' de la hormona del crecimiento de pcDNA5/RFT/V5-His (Invitrogen) mediante un método de unión por PCR estándar. Se insertó el marcador de higromicina completo en el sitio Cla I de los

plásmidos de expresión de Notch1. Este plásmido se renombró Notch1/hig. Para mejorar la actividad de Notch1, se eliminó el dominio PEDT (Weng, A.P., et. al, Science, 2004, 9265-9273 et. al.) de Notch1/hig mediante mutagénesis dirigida al sitio (Genewiz, South Plainfield, NJ). El plásmido resultante se denominó Notch1-dPEST. El plásmido de cADN humano Jagged1 se obtuvo de Open Biosystems (Huntsville, AL). La región codificante Jagged1 se sintetizó por PCR y se insertó en el vector de expresión pcDNA3.3-TOPO (Invitrogen).

Se generaron líneas celulares del ensayo dependiente de Notch1 cotransfectando plásmidos Notch1/hig y CSLuc en células U2-OS (número de ATCC HTB-96, Manassas, VA) o cotransfectando Notch1-dPEST y CSLuc en células 293T (número ATCC CRL-11268, Manassas, VA) mediante el uso de LipoFectamine 2000, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen). Se seleccionaron por clonación células transfectadas de manera estable con 200~800 µg/ml de higromicina en un medio de crecimiento DMEM (Invitrogen); los clones celulares se cribaron mediante análisis Western blot, como se describe en el Ejemplo 1, y mediante ensayo indicador de luciferasa descrito en las siguientes secciones. Se seleccionó una línea celular con un nivel relativamente alto de expresión de Notch1 (en función de Western blot) y actividad de luciferasa inducida por Delta tipo 4 (Dll4) para usar en un ensayo funcional. Esas dos líneas celulares de ejemplo son U2-OS/Notch1-CSLuc (sobrenombre: N1CU3) y 293/Notch1-dPEST-CSLuc (sobrenombre: N1dP-c16). Mediante un procedimiento similar, se generó una línea celular que expresaba de manera estable Jagged1 humano de una línea celular parental, Hela (ATCC número CCL-2). La línea celular se denominó Hela/JAG1.

Ensayo indicador de luciferasa e indentificación de clones de hibridomas antagonistas de Notch1.

Para identificar clones de hibridomas inhibidores de Notch1, se realizó un ensayo indicador de luciferasa para evaluar la actividad de Notch1 inducida por Dll4 en células N1CU3. Las placas de cultivo tisular de 96 cavidades (BD Bioscience) se recubrieron con 50 a 100 nanogramos (ng) de Dll4 recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) por cavidad. Se sembraron células N1CU3 a razón de 50.000 células por cavidad en las placas recubiertas con Dll4 o BSA, se agregaron al mismo tiempo de 30 a 50 µl de medios condicionados de clones de hibridomas y se cultivaron durante 24 a 40 horas. Al final del cultivo, se lisaron directamente las células en 1 x amortiguador de lisis pasivo (Promega, Madison, WI) después de retirar todo el medio,

y se evaluaron las actividades indicadoras de luciferasa con el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega, Madison, WI) y con el luminómetro MicroLumat Plus LB 96V (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Los sobrenadantes de hibridomas con una inhibición significativa desde el punto de vista estadístico para la actividad indicadora de Notch inducida por Dll4 se sometieron a purificación por afinidad mediante la columna de proteína G (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los mAb purificados se analizaron también mediante ensayos indicadores de luciferasa nuevamente para confirmar la función inhibidora de la señalización dependiente de Notch1.

Caracterización de mAb anti Notch1 mediante ensayos indicadores de luciferasa

Entre los mAb que inhiben la señalización mediada por Notch1, un mAb (N248A) mostró la actividad inhibidora más potente, que se caracterizó en detalle mediante varios ensayos indicadores de luciferasa diferentes. La Figura 3 muestra que mAb N248A tuvo una potencia muy superior para inhibir la señalización de Notch1 inducida por el ligando Dll4 en comparación con la de la pareja de mAb, mAb-C, cuando se recubrió Dll4 en la superficie de la placa de cultivo para inducir la señalización de Notch. Se usaron células 293/Notch1-dPEST-CSLuc en el ensayo. Los números del eje y son lecturas de la actividad indicadora de luciferasa.

Para evaluar si mAb N248A puede inhibir otra señalización de Notch inducida por el ligando, se cocultivaron células Hela/Jagged1 y N1dP-c16, y se realizó el ensayo indicador de luciferasa descrito anteriormente. De hecho, mAb N248A inhibió por completo la señalización de Notch1 inducida por Jagged1 (Figura 4).

Ejemplo 4: Determinación de la afinidad de unión al anticuerpo

La afinidad de unión física de mAb N248A anti Notch1 al antígeno Notch1 se midió en un instrumento de resonancia plasmónica superficial Biacore 3000 equipado con un chip sensor de búsqueda (tipo de chip: CM5) usando amortiguador de corrida HBSP (Biacore AB, Uppsala, Suecia – ahora GE Healthcare) más 1 mM de CaCl₂. La proteína A se acopló con la amina a niveles de saturación sobre el chip con una química estándar N-hidroxisuccinimida/etildimetilaminopropil carbodiimida (NHS/EDC). Se capturó la proteína N1-NRR-TM(-)Fc (descrita en el Ejemplo 1) en la superficie del chip mediante Proteína A en las tres celdas de flujo a 40, 13, 4 ug/ml. Se diluyó mAb N248A anti Notch1 en una serie de 3 veces, inyectado durante 1 min a 100 µl/min. Se controló la disociación durante 20 minutos. Se regeneró el chip después de la última

inyección de cada titulación con dos impulsos de 30 segundos de 100 mM de ácido fosfórico. Los ciclos de amortiguador proporcionaron espacios en blanco para incorporar una referencia doble de los datos, que luego se ajustó globalmente a un modelo de unión simple con el software Biaevaluation v.4.1. Las afinidades se dedujeron del cociente de las constantes de velocidad cinética ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Los datos muestran que mAb N248A tiene $K_{on} = 5,19e-5$ (Ms), $K_{off} < 1,7e-4$ (1/s) y $K_D < 0,33$ nM. La K_D ajustada se proporciona mediante K_{on} rápida y K_{off} muy lenta, que es más lenta que la que puede resolverse mediante nuestro ensayo (remitirse a la regla del 5%, manual de Biacore 3000).

Ejemplo 5: Análisis de epítomos de unión a mAb antagonista de Notch1

Mapeo de epítomos de unión a mAb mediante intercambio de dominio con Notch2 humano

Para comprender el mecanismo de acción de mAb antagonista de Notch1, se analizaron epítomos de unión de mAb antagonistas de Notch1 mediante intercambio de dominio y ensayo de unión ELISA. La proteína Notch1-NRR-TM(-)/Fc se dividió en 6 dominios: EGF (que incluye EGF35-36), Lin12-A (o Lin-A), Lin-B, Lin-C, dominio N de heterodimerización (o HD-N) y HD-C (Figura 5). Cada uno de los dominios se intercambió por el que correspondía al Notch2 humano mediante síntesis por PCR en una serie de constructos de expresión de Notch1-NRR-TM(-)/Fc quimérico. Los plásmidos con intercambio de dominio se transfectaron en células 293-F de Freestyle™ (Invitrogen, Inc., Calsbad, CA) usando reactivo Freestyle™ Max (Invitrogen), como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. Después de cultivarlos durante 3 días, los medios condicionados se sometieron a un análisis Western blot y a un ensayo de unión ELISA mediante mAb Notch1. El análisis Western blot (método que aparece en el Ejemplo 1) mostró que 5 de los 6 constructos con intercambio de dominio se expresaron correctamente, excepto que el intercambio de Lin-B/Notch2 se expresó de manera deficiente.

En el ensayo ELISA, los 100 microlitros del medio condicionado del cultivo celular transfectado con plásmidos de antígeno anterior se cargaron en cada cavidad de la placa de 96 cavidades, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 4 h o a 4 °C durante la noche. Luego, se retiró el medio condicionado de las placas recubiertas. Para la unión al anticuerpo primario, se agregaron 300 ng de cada mAb (Tabla 3) en 100 microlitros de PBS a la cavidad recubierta. El resto del procedimiento ELISA es igual al que se describe en el Ejemplo 2. mAb N99a, N326A y

N440A eran anticuerpos monoclonales que se unen a Notch-1, generados y aislados mediante los mismos procedimientos que los de mAb N248A. Como se muestra en la Tabla 3, la unión de mAb N248A a los antígenos quiméricos se eliminó por completo cuando se intercambió el dominio Lin-A o HD-C con el correspondiente dominio de Notch2. Por otra parte, el intercambio de los dominios EGF, Lin-C o HD-C no afectó su unión. Los mAb N326A y N440A eran muy diferentes de mAb N248A. Estos dos mAb requieren dominios HD-N y HD-C para su actividad de unión. N99A es, en cierto modo, similar a mAb N248A, en cuanto a que su unión requiere dominios Lin-A y HD-C. Sin embargo, el intercambio del dominio HD-N también redujo la actividad de unión de N99A. Estos datos respaldaron la conclusión de que mAb N248A tiene al menos dos conjuntos diferenciables de epítomos de unión, uno en el dominio Lin-A y el otro en el dominio HD-C. En un experimento separado, se resolvió si hay otro epítipo en el dominio Lin-B. De manera similar, los otros tres mAb antagonistas de Notch1 tienen dos conjuntos identificables de epítomos de unión, uno en el dominio HD-C y el otro en los dominios de la subunidad del terminal N de Notch1. En función de las estructuras de cristal de las regiones RNN de Notch1 (Gordon, WR et al., Blood, 2009, Volume 113, 4381-4390) y Notch2 (Gordon et al., Nature Structure Molecular Biology, 2007, Volume 14, 295-300) publicadas recientemente, los tres dominios Lin12 envuelven los dominios HD, bloqueando la activación y escisión aleatoria mediante proteasa ADAM y, de este modo, manteniendo el receptor en estado inactivo o silencioso. El mAb N248A se une a Notch1 en dos conjuntos distintos de epítomos, lo cual provoca que Notch1 quede bloqueado en la conformación silenciosa y, de este modo, evita que el receptor sea activado por sus ligandos.

Se han informado mutaciones génicas de Notch1, mayormente mutaciones puntuales, y algunas eliminaciones e inserciones pequeñas, en más del 50 % de T-ALL (Weng, A.P., et. al, Science, 2004, 9265-9273; Malecki et al., Molecular Cell Biology, 2006, 26(12):4642-4651). Las mutaciones se agrupan en dos regiones: una en el terminal C de la porción intracelular y la otra en el dominio HD-N. Estos hallazgos respaldan la noción de que mAb N248A tendría una mayor utilidad terapéutica en T-ALL que los otros tres mAb enumerados en la Tabla 3, porque el intercambio del dominio HD-N no afectó la unión de mAb N248A a Notch1, mientras que la unión de los otros tres resultó afectada (véase la Tabla 3).

Tabla 3. Lectura de ELISA de la unión de mAb Notch1 a los antígenos quiméricos

mAb →		N248A	N99A	N326A	N440A
Antígeno quimérico de Notch1 intercambiado con el dominio de Notch2 correspondiente	EGF	3,51	3,20	3,48	2,85
	Lin-A	0,05	0,04	3,47	3,28
	Lin-B	n/a	n/a	n/a	n/a
	Lin-C	3,48	3,17	3,50	2,83
	HD-N	3,52	1,25	0,10	0,12
	HD-C	0,04	0,04	0,05	0,07

N248A se une a Notch1 humano, pero no a Notch1 de ratón

Para ubicar los epítomos de unión de N248A1, se generaron plásmidos de expresión de Notch1-NRRHD murinos que contenían regiones codificantes de cADN de Notch1 de ratón desde los nucleótidos 1-99 y el nucleótido 4327 hasta el 5169 (número de acceso a NCBI, NM_008714), y se realizaron transfección transitoria y ensayo de unión ELISA (métodos descritos en las secciones anteriores, Ejemplos 1 y 5). Los resultados mostraron que N248A1 no se une a Notch1 de ratón y que solo se une a Notch1 humano (Tabla 4). También se realizaron constructos de expresión de Notch1-NRRHD quimérico con intercambio de dominio usando la secuencia de Notch1-NRRHD humano (nucleótidos 1-129 y 4338-5202, número de acceso a NCBI NM_017617) como marco, y se intercambiaron sistemáticamente los dominios Lin-A, Lin-B o HD-C humanos con los correspondientes dominios de ratón. Un ensayo de unión ELISA que utilizó esta proteína con intercambio de dominio humano/de ratón como cebo demostró que se elimina la unión de N248A1 al antígeno Notch1 humano cuando el dominio Lin-A se intercambia con la secuencia de ratón, mientras que el intercambio de dominios Lin-B o HD-C no afectó la unión. Por el contrario, el otro mAb de control, 22F7, pierde unión solo cuando se intercambia Lin-B con la secuencia de ratón. Por lo tanto, el epítopo de unión que determina si N248A1 solo se une a Notch1 humano, no al de ratón, se ubica en el dominio Lin-A.

Tabla 4. Lecturas de ELISA de la unión de mAb Notch1 a los antígenos humanos, de ratón y quiméricos

Antígenos		N248A	22F7
huN1-NRRHD		3,13	3,19
MuN1-NRRHD		0,17	0,09
El antígeno quimérico Notch1 indicó intercambio de dominio con la secuencia murina	Mu/Lin-A	0,33	3,27
	Mu/Lin-A	3,37	0,38
	Mu/HD-C	3,17	3,19

Identificación del epítipo de unión de N248A1 en el dominio Lin-A

Para identificar el epítipo de unión de N248A1 en el dominio Lin-A, se mutaron los dos aminoácidos que son diferentes en los dominios Lin-A humano y de ratón, es decir, 1457E/A y 1465S/N, (Tabla 5). Los resultados de ELISA mostraron que la mutación 1457E/A no afectó la unión, pero la mutación 1465S/N eliminó la unión, lo cual indica que el aminoácido Asn (N) en Lin-A de ratón es el único residuo aminoácido responsable de bloquear la unión de N248A1 a Notch1 de ratón. Varios aminoácidos que rodean a 1465S se mutaron de manera secuencial con alanina (Tabla 5). La mutación de 1463V/A, 1466L/A o 1467Q/A también eliminó la unión de N248A1. Sin embargo, el mAb A2 de control no resultó afectado por las mutaciones 1463V/A o 1465S/N (Tabla 5). Estos experimentos demostraron que el epítipo de unión de N248A1 en Lin-A incluye 1463V, 1465S, 1466L y 1467Q.

Tabla 5. Análisis de mutaciones puntuales de N248A1 y actividad de unión ELISA

Antígenos	Secuencia de Lin-A	Actividad de unión	
		N248A1	A2
huN1-NRRHD	ACELPECQ <u>E</u> DAGNKVC <u>S</u> LQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	100%	100%
mu/Lin-A	ACELPECQ <u>V</u> DAGNKVC <u>N</u> LQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	11%	151%
Mutante 1457E/A	ACELPECQ <u>A</u> DAGNKVC <u>S</u> LQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	112%	110%
Mutante 1462K/A	ACELPECQ <u>E</u> DAGN <u>A</u> VCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	85%	88%
Mutante 1463V/A	ACELPECQ <u>E</u> DAGNK <u>A</u> CSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	6%	56%
Mutante 1465S/N	ACELPECQ <u>E</u> DAGNKVC <u>N</u> LQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	8%	109%

Mutante 1466L/A	ACELPECCQ <u>E</u> DAGNKVCS <u>A</u> QCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	1%	4%
Mutante 1467Q/A	ACELPECCQ <u>E</u> DAGNKVCS <u>L</u> QCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	4%	16%

Identificación del epitopo de unión de N248A1 en el dominio HD-C

Se generó una serie de 5 antígenos quiméricos con intercambio de subdominio (Tabla 6) mediante el intercambio secuencial de agrupaciones de aminoácidos de la secuencia de Notch1 con la secuencia de Notch2. Los resultados de ELISA mostraron que el intercambio de subdominio 1 redujo considerablemente la unión de N248A1, mientras que los otros 4 antígenos con intercambio de subdominio no afectaron la unión de N248A1. Por otra parte, el mAb 19H7 de control paralelo mostró una reducción considerable de la afinidad de unión en el intercambio de subdominios 1, 3 y 5 (Tabla 6). La totalidad de la expresión y secreción de los antígenos con intercambio de subdominios en los medios condicionados se confirmó mediante análisis Western blot (métodos antes mencionados). Todos los antígenos con intercambio de subdominio, salvo el intercambio de subdominio 5, tienen una expresión igual o mayor que la proteína Notch1-NRRHD (huN1-NRRHD) humana. El intercambio de subdominio 5 se expresó a un nivel de alrededor de 50 % de huN1-NRRHD sobre la base de la comparación de intensidad de banda del Western blot (datos no mostrados). Estos experimentos mostraron que el epitopo de unión de N248A1 en HD-C incluye 5 aminoácidos, 1705G, 1706A, 1707L, 1709S y 1710L (secuencia de cADN que codifica Notch1 humano, número de acceso a NCBI NM_017617), como se resalta en la Tabla 6.

Tabla 6. Lecturas de ELISA de la unión de mAb Notch1 a Notch1-NRRHD humano, y antígenos quiméricos con intercambio de subdominio con las secuencias de Notch2

Antígenos	Secuencia de HD-C	Actividad de unión	
		N248A1	19H7
huN1-NRRHD	FLGALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQKRR	3,05	2,92
Intercambio de subdominio 1	FLASHAIQG	0,48	0,48
Intercambio de subdominio 2	GTLNISYP	2,76	2,51
Intercambio de subdominio 3	KLVS V SE	2,81	0,2
Intercambio de subdominio 4	ESLETPP	2,89	2,62
Intercambio de subdominio 5	PERTQKSR	1,48	0,62

Ejemplo 6: mAb Notch1 inhibe el crecimiento celular del cáncer en cultivo celular

Inhibición del crecimiento celular de la leucemia HPB-ALL y reducción de NICD mediante mAb N248A

La línea celular de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), HPB-ALL, se derivó de una T-ALL de la niñez (Morikawa et al., Int J. Cancer, 1978, 21(2):166-70) y se obtuvo de DSMZ (Braunschweig, Alemania). Esta línea celular contiene una mutación de Notch1 que produce altos niveles de dominio intracelular Notch1 (NICD), la forma activa de Notch1, como resultado de la escisión de gamma secretasa mejorada. Para los ensayos de inhibición del crecimiento, se sembraron células HPB-ALL en placas de 96 cavidades a razón de 10.000 célula/cavidad en medio RPMI1640 enriquecido con 10 % de FBS (Invitrogen). Al comienzo se agregó mAb N248A o D16A diluidos en serie, y se cultivaron células a 37 °C durante 7 días. Al final del cultivo, se agregó a las células solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contenía 0,1 mg/ml de Resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y las placas se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Se leyeron señales fluorescentes a través de filtros duales con excitación = 560 nm y emisión = 590 nm. Se calcularon los valores IC₅₀ mediante la respuesta a la dosis sigmoidal (inclinación variable) en GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Para el análisis de NICD *in vitro*, se sembraron células HPB-ALL en placas de 6 cavidades a razón de 2 x 10⁶ células por cavidad y se cultivaron en RPMI1640 con 10 % de FCS (Invitrogen). Se agregó mAb N248A o anticuerpo de control D16A al cultivo con concentraciones variables, como se indica en la Figura 6. Las células se cultivaron en presencia de anticuerpos a 37 °C durante 24 horas. Luego, se recolectaron y lisaron en amortiguador de lisis celular frío 1x (Cell Signaling Technologies, Boston MT). Se extrajeron proteínas del lisato celular mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Las concentraciones proteicas se determinaron con un ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL). El nivel de NICD en cada muestra se determinó mediante análisis Western blot.

En cada análisis de Western blot, se resolvieron alrededor de 50 µg de lisato mediante electroforesis a través de gel de poliacrilamida (BioRad Laboratories, Hercules, CA) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se sometió a análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo anti NICD de conejo (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) y anticuerpo actina α de ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se usaron anticuerpos secundarios conjugados IRDye 680 o

800 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) para visualizar las bandas de Western blot. Las imágenes se analizaron con el sistema Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Los resultados mostraron que la inhibición del crecimiento celular de HPB-ALL por mAb N248A se correlaciona con la reducción de los niveles de NICD. Una vez transcurridas 24 horas del tratamiento, mAb N248A redujo los niveles de NICD de manera dependiente de la dosis; la máxima reducción se observó a 30 $\mu\text{g/mL}$. Luego de 7 días de tratamiento, mAb N248A causó una inhibición considerable del crecimiento celular. El valor IC_{50} de la inhibición del crecimiento celular es aproximadamente 0,78 $\mu\text{g/ml}$ o $\sim 5,2 \text{ nM}$.

Inhibición del crecimiento celular del cáncer de mama

Se documentó que la expresión de Notch1 aumentó de manera anormal en el cáncer de mama (Reedijk et al. Cancer Research, 2005, 65(18):8530-8537; Klinakis et al., 2006; Efstratiadis et al., Cell Cycle, 2007, 6(4):418-429), lo cual se asoció a una baja tasa de supervivencia (Reedijk et al. Cancer Research, 2005, 65(18):8530-8537). En los ratones transgénicos que expresaban la forma activada de Notch1 en el tejido mamario, prácticamente todos los ratones desarrollaron cáncer de mama en un año (Hu et al., American Journal of Pathology, 2006, 168(3):973-990). Para evaluar la hipótesis de que el bloqueo de la señalización mediada por Notch1 inhibiría el crecimiento celular del cáncer de mama, se cultivaron varias líneas celulares del cáncer de mama en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo mAb N248A, Herceptin (Genentech/Roche, South San Francisco, CA) o inmunoglobulina G de ratón de control (mIgG). Todas las células se cultivaron en RPMI 1640 (Invitrogen) con 1 % de FCS durante dos a tres días. Las células viables se cuantificaron mediante Cell Titer GlowTM (Promega) y se analizaron mediante el luminómetro MicroLumat Plus LB 96V (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Para el mismo panel de células del cáncer de mama, se analizó la expresión de Notch1 y Jagged1 en la superficie celular mediante FACS. Los resultados mostraron que la inhibición del crecimiento de las células del cáncer de mama mediante mAb N248A se correlaciona, en términos generales, con el nivel de expresión de Notch1 y Jagged1. mAb N248A ejerce la inhibición más fuerte de células MDA-MB-231, lo cual expresa un nivel relativamente alto de Notch1 y Jagged1. Cabe destacar que la línea celular derivada de BT475, resistente a heceptina, BT475HR, mostró una mayor expresión de Notch1 y Jagged1, en comparación con la línea celular parental BT475. mAb N248A inhibió el crecimiento

celular de BT475HR, mientras que heceptina no lo hizo. Los datos indicaron la posible utilidad de mAb N248A en el tratamiento terapéutico del cáncer de mama, el cual tiene una mayor expresión de Notch1 o es resistente al fármaco actual, Herceptin.

Tabla 7. Ensayo de la inhibición del crecimiento de las células tumorales de anti Notch1 mAb, N248A. El índice de expresión representa la cantidad de veces que aumenta la media geométrica FACS después de inmunotefñir las células del cáncer de mama con anticuerpo anti Notch1 o anti Jagged1. El índice de proliferación celular relativa representa el porcentaje de célula de control cultivada en paralelo sin agregar ningún agente. BT-474HR es una línea celular resistente a Herceptin derivada de BT-474 (ATCC).

Tabla 7

Líneas celulares	Índice de expresión		Índice de proliferación celular relativo		
	Notch1	Jagged1	N248A	Herceptin	mIgG
MDA-MB-231	1,7	4,4	69	96	103
BT-474HR	2,5	3,0	80	97	99
HCC38	1,5	1,8	86	97	99
HCC1954	1,5	1,8	88	94	99
SKBR3	1,6	1,2	97	84	107
BT-474	1,4	1,0	98	68	98
MCF7	1,2	1,1	98	101	95
BT549	1,1	1,1	115	103	112

Para confirmar que la inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama por N248A es mediada por la señalización de bloqueo de Notch, se evaluó la expresión de dos genes objetivo corriente abajo Notch conocidos mediante reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (QRT-PCR). Las células MDA-MB-231 se cultivaron en presencia de N248A o mAb de control durante dos días y, luego, se cosecharon para aislar el ARN total usando el kit de reactivo RNAeasy y el protocolo (Qiagen). Los resultados mostraron que mAb N248A si bloqueó la expresión de HES1 y HES4 (Figura 7), lo cual confirma el mecanismo de acción de N248A.

Ejemplo 7: Notch1 mAb inhibe la leucemia linfobástica aguda de linfocitos T (T-ALL) en el modelo de xenoinjerto tumoral murino

Inhibición del crecimiento tumoral T-ALL por Notch1 mAb

Para establecer el modelo de xenoinjerto T-ALL en el modelo de ratón, se obtuvieron ratones hembra Nude (Nu/Nu) atímicos inmunodeprimidos (promedio de 20 gramos, 6-8 semanas de edad) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA), y se las albergó en condiciones específicas sin patógenos según las indicaciones de la Association for the Assessment and Accreditation for Laboratory Animal Care, International. Los animales recibieron comida estéril para roedores y agua *ad libitum*. Todos los estudios *in vivo* se realizaron con protocolos de uso y cuidado de animales experimentales aprobados.

Las células HBP-ALL se recolectaron de un cultivo nuevo antes de implantarlas en el ratón huésped, y se lavaron una vez y se resuspendieron en un medio estéril sin suero. La suspensión celular se ajustó a una densidad adecuada y se enriqueció con 50 % de Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) para facilitar la obtención del tumor. Se implantaron de manera subcutánea un total de $5-10 \times 10^6$ células en 200 μ L en flanco trasero del ratón, y se permitió que crecieran hasta alcanzar el tamaño designado antes de la administración del anticuerpo para cada experimento.

Para el estudio de la eficacia antineoplásica, los animales que tenían tumores HPB-All de 150-300 mm³ de tamaño se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos y recibieron N248A a 1 mg, 3 mg y 10 mg por kilogramo (kg), respectivamente, o recibieron anticuerpos de control D16A a 5 mg por kg. Se inyectaron mAb de manera subcutánea una vez por semana durante 2 semanas. El peso corporal del animal y las mediciones tumorales se obtuvieron cada 2-3 días. El volumen tumoral (mm³) se midió con calibres Vernier y se calculó con la fórmula: longitud (mm) x ancho (mm) x ancho (mm) x 0,4. El volumen tumoral de los ratones tratados con el fármaco y tratados con el vehículo el último día del estudio se usó para calcular el porcentaje (5) de los valores de inhibición como $100 - \{1 - [(Tratado_{último\ día} - Tratado_{día\ 1}) / (Control_{último\ día} - Control_{día\ 1})]\}$. Para todos los experimentos de inhibición del crecimiento tumoral (TGI), se usaron de 8 a 10 ratones por grupo de dosis. Se usó la prueba de Student para determinar *P*.

Como se indica en la Figura 8, Notch1 mAb, N248A, mostró tener actividad antineoplásica intensa en este modelo luego de 11 días de tratamiento, es decir, dos dosis semanales. El promedio de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en el grupo de 10 mg/kg con respecto al grupo de control mAb es mayor de 77 %, lo cual es muy importante en términos estadísticos ($P < 0,01$). TGI fue, en términos generales, dependiente de la dosis, excepto que los dos grupos con menores dosis, 1 mg/kg y 3

mg/kg, fueron demasiado cercanos como para diferenciarlos. Las causas exactas de esta observación son inciertas, pero es probable que se deba a la alta variabilidad del tamaño del tumor de este modelo. N248A, como inhibidor específico de Notch1 humano, fue bien tolerado por los ratones, sin causarles una pérdida de peso considerable, morbilidad o mortalidad en ninguno de los grupos de tratamiento.

Farmacocinética y farmacodinámica (PK/PD) de Notch1 mAb en ratones

Para el estudio de PK/PD, los ratones que tenían tumores cuyo tamaño variaba de 300-800 mm³ recibieron una sola dosis de N248A a 5 mg/kg mediante inyección subcutánea. Luego de la administración de N248A, los ratones se sometieron a eutanasia en los puntos temporales de 6, 16 horas y 1, 2, 3, 5 días. Se tomaron muestras sanguíneas del ventrículo izquierdo con una jeringa y se las transfirió a tubos cebados con sulfato de heparina. Mientras tanto, los tumores se retiraron mediante resección, se congelaron de manera instantánea y se homogeneizaron en amortiguador de lisis celular frío 1x (Cell Signaling Technologies, Boston MT). Se extrajeron las proteínas del lisato tumoral, y se determinó el nivel de NICD en cada muestra tumoral mediante análisis el Western blot descrito anteriormente. Las muestras sanguíneas se sometieron a centrifugación para separar el suero de las células sanguíneas. El nivel de N248A en suero se evaluó mediante el método ELISA, como se describe en el Ejemplo 2. Primero, la placa de ELISA se recubrió con mAb específico de Fc humano, que captura el antígeno Notch1-NRR-TM(-)/Fc. A su vez, el antígeno Notch1 se une a Notch1 mAb, N248A, en el suero.

La curva de PK indicó que N248A mAb alcanzó la concentración máxima (~235 nM) en el suero del ratón 24 horas después de la inyección. La vida media estimada es de alrededor de 4,5 días (Figura 9). La evaluación del marcador directo para la activación de Notch1 (es decir, NICD) mostró que las muestras tumorales cosechadas de los ratones tratados con N248A tenían una reducción intensa de NICD, la cual se mantuvo hasta 5 días después de la administración de la dosis (Figura 10). Por el contrario, el control mAb, D16A, no redujo el nivel de NICD (no se muestran los datos). La inhibición máxima de NICD causada por N248A a 5 mg/kg fue de aproximadamente 80 %.

Ejemplo 8: Clonación y secuenciación de Notch1 mAb, N248A

Se determinaron las secuencias de las regiones variables de mAb N248A. Primero, se evaluó el subtipo IgG del anticuerpo mediante un kit de anticuerpo

monoclonal de ratón Isostrip (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Los resultados indicaron que N248A tiene una cadena pesada IgG₁ y una cadena liviana lambda. Para la clonación y secuenciación de mAb N248A, se cosecharon y lisaron 1×10^6 de células de hibridoma, a fin de aislar el ARN celular total usando el kit RNeasy Mini Reagent y el protocolo del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). Se sintetizó el cADN monocatenario en los moldes de ARN usando transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen). Los cADN de las regiones variables de la cadena liviana y de la cadena pesada se amplificaron mediante PCR del cADN monocatenario mediante el uso de cebadores directos degenerados complementarios del extremo 5' de la secuencia codificante de la cadena lambda de ratón y un cebador inverso que coincidía con la región constante adyacente al extremo 3' de la región variable; o mediante el uso de cebadores directos degenerados complementarios del extremo 5' de la secuencia codificante de la cadena pesada IgG₁ de ratón y un cebador inverso respectivo de la región constante IgG₁. Las condiciones de ciclización por PCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 96 °C durante 1 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 20 s, 50 °C durante 20 s y 72 °C durante 30 s. Los productos de PCR resultantes se clonaron en el vector pCR-4-TOPO (Invitrogen), se secuenciaron mediante métodos convencionales y se analizaron con el software Vector NTI Advance (Invitrogen). Las secuencias de anticuerpos clonados se confirmaron mediante la comparación directa con las secuencias del terminal N obtenidas del anticuerpo derivado de hibridoma purificado, como se determinó mediante espectrometría de masa (Univ. of CA, Davis, Molecular Structure Facility). Los resultados recopilados de las secuencias mostraron que la región variable de la cadena pesada mAb N248A contiene 121 residuos de aminoácidos, y la cadena liviana contiene 109 residuos de aminoácidos. Otro análisis de la secuencia N248A mAb V_H y la secuencia V_L usando el sistema Kabat de la región determinante CDR produjo la delineación de las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3, y de las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de mAb N248A se muestran en la Figura 15 como secuencias 15-20 (SEQ ID NO: 15-20). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana de mAb N248A se muestran en la Figura 14 como secuencias 9-14 (SEQ ID NO: 9-14). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena liviana de mAb N248A se muestran en la Figura 13 como secuencias 5-8 (SEQ ID NO: 5-8).

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno de este, que se une específicamente a Notch-1 humano, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se unen, al menos, a un primer epítipo y un segundo epítipo, en donde el primer epítipo reside en el dominio Lin-A de Notch-1 humano, y el segundo epítipo reside en el dominio HD-C de Notch-1 humano.
2. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se unen al primer epítipo y al segundo epítipo, y el primer epítipo y el segundo epítipo son los únicos epítipos principales a los que se unen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno.
3. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el primer epítipo es un epítipo principal que comprende de 1 a 4 residuos de aminoácidos seleccionados de 1463V, 1465S, 1466L y 1467Q.
4. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en donde el segundo epítipo es un epítipo principal que comprende de 1 a 5 residuos de aminoácidos seleccionados de 1705G, 1706A, 1707L, 1709S y 1710L.
5. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en donde una sustitución no conservadora de cualquiera de los residuos de aminoácidos del primer epítipo da como resultado una pérdida de más del 80 % de afinidad de unión del anticuerpo o porción de unión al antígeno con el Notch-1 humano.
6. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son humanizados, humanos o quiméricos.
7. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son un anticuerpo de ratón.
8. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se unen a Notch-1 humano con un K_D de 1×10^{-4} M o menor.
9. Un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión al antígeno de este, que se unen específicamente al Notch-1 humano, que comprende:
 - (i) una región variable CDR1 de la cadena pesada, que comprende la

secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:18 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO: 18;

(ii) una región variable CDR2 de la cadena pesada, que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:19, o una variante de esta en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO: 19; y

(iii) una región variable CDR3 de la cadena pesada, que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:20 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO: 20.

10. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 9, en donde cualquiera de las modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada son una sustitución conservadora de los residuos de aminoácidos de este.

11. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 9, en donde no se modifica ninguna de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada.

12. Un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión al antígeno de este, que se une específicamente al Notch-1 humano, que comprende:

(i) una región variable CDR1 de la cadena liviana, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:12 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:12;

(ii) una región variable CDR2 de la cadena liviana, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:13 o una variante de esta, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO:13; y

(iii) una región variable CDR3 de la cadena liviana, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:14 o una variante de este, en donde se modifican 1-4 residuos de SEQ ID NO: 14.

13. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 12, en donde cualquiera de las modificaciones de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana son una sustitución conservadora de los residuos de aminoácidos de este.

14. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 12, en donde no se modifica ninguna de las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana.

15. Un anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno de este, que se unen específicamente al Notch-1 humano, que comprende:

- (i) una región variable CDR1 de la cadena pesada, que comprende SEQ ID NO: 18,
- (ii) una región variable CDR2 de la cadena pesada, que comprende SEQ ID NO: 19,
- (iii) una región variable CDR3 de la cadena pesada, que comprende SEQ ID NO: 20,
- (iv) una región variable CDR1 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 12,
- (v) una región variable CDR2 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 13, y
- (vi) una región variable CDR3 de la cadena liviana, que comprende SEQ ID NO: 14,

en donde se pueden modificar 1-4 residuos amino de cada CDR de la cadena liviana y de cada CDR de la cadena pesada.

16. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 15, en donde cualquiera de las modificaciones de las CDR de la cadena liviana y las CDR de la cadena pesada son una sustitución conservadora de los residuos de aminoácidos de esta.

17. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 15, en donde no se modifica ninguna CDR de la cadena liviana ni ninguna CDR de la cadena pesada.

18. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son un anticuerpo de ratón o la porción de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón.

19. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-17, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno son humanizados, humanos o quiméricos

20. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se une a Notch-1 humano con una constante de disociación en equilibrio K_D menor de 1×10^{-5} M.

21. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se une a Notch-1 humano con una constante de disociación en equilibrio K_D menor de 2×10^{-6} M.

22. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se une a Notch-1 humano con una constante de disociación en equilibrio K_D menor de 1×10^{-6} M.
23. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se une a Notch-1 humano con una constante de disociación en equilibrio K_D menor de 2×10^{-6} M.
24. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-17, que es un anticuerpo humano de longitud completa de las subclases IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.
25. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-17, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado de las subclases IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.
26. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-17, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico de las subclases IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.
27. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26.
28. Una línea celular que produce de manera recombinante el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26.
29. Un oligonucleótido que codifica la cadena pesada o la cadena liviana del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26.
30. Un método para tratar el cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, o una composición farmacéutica de este.
31. El anticuerpo o la porción de unión al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, o una composición farmacéutica de este, para usar en el tratamiento del cáncer.

RESUMEN

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a Notch1. En una forma de realización, los anticuerpos se unen, al menos, a un primer epítipo y un segundo epítipo, en donde el primer epítipo reside en el dominio LinA de la región de regulación negativa (NRR) de Notch1, y el segundo epítipo reside en el dominio HD-C de la NRR de Notch1.

FIG. 1

PCR synthesis of N1-NRR-TM(-) cDNA

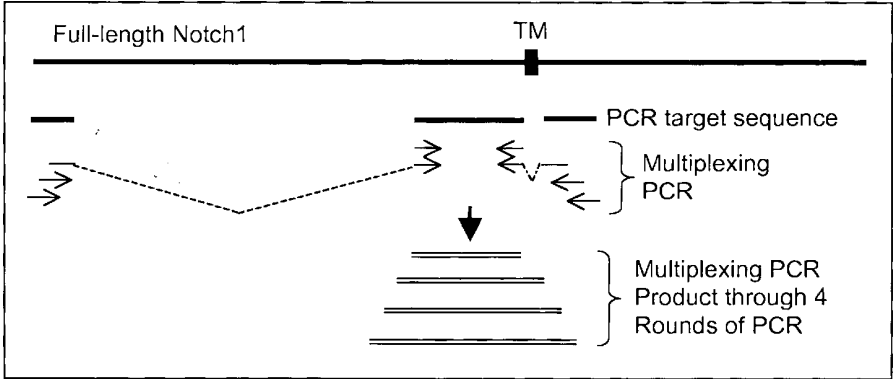
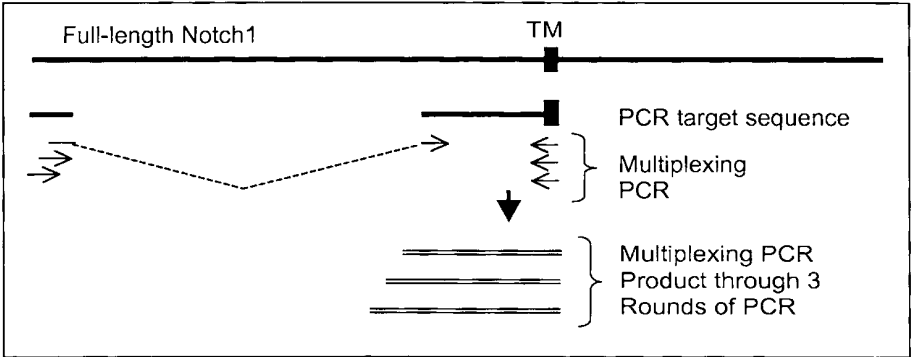
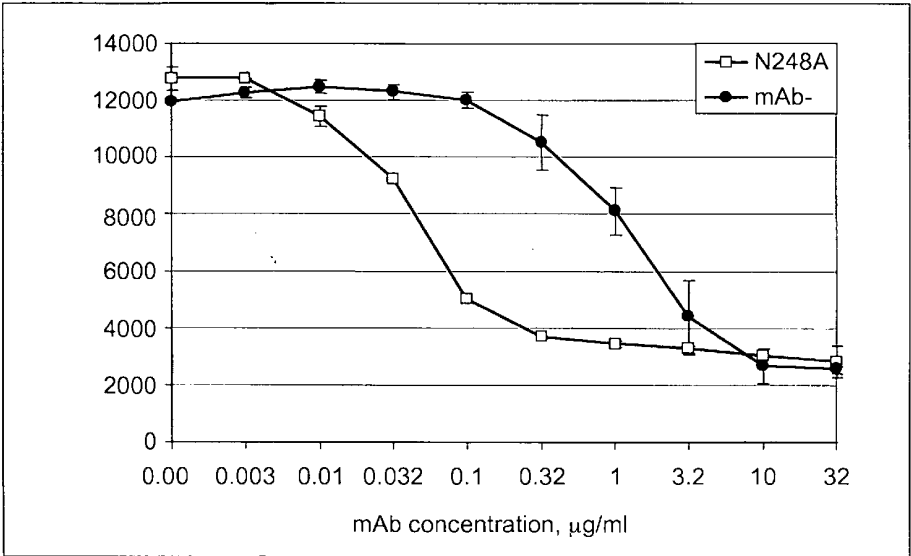


FIG. 2
PCR synthesis of N1-NRR-TM(+) cDNA



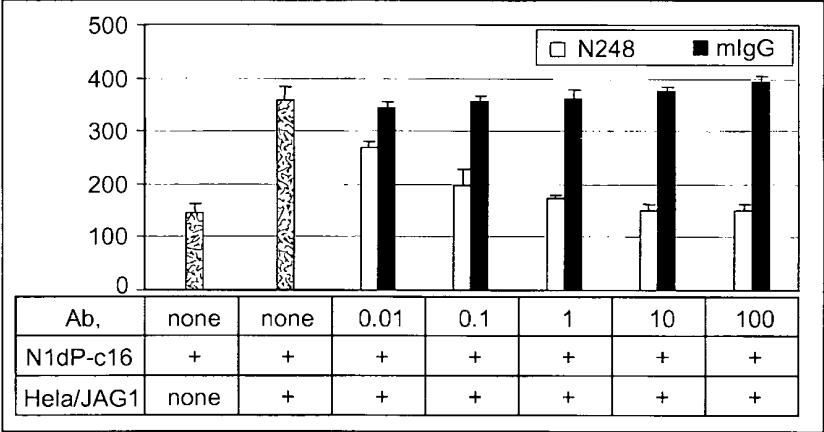
Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

FIG. 3



Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

FIG. 4



5/10

FIG. 5

1	1	E	C	Q	F	P	A	S	S	P	C	L	G	G	N	P	C	Y	N	Q	G	T	C	E	P	T	S	E	S	P	F	N1	
1	1	D	C	E	-	-	-	-	S	E	C	-	A	S	S	P	C	Q	H	G	G	S	C	H	P	Q	R	Q	P	P	Y	N2	
3131		Y	R	C	L	C	P	A	K	F	N	G	L	L	C	R	I	L	D	Y	S	F	G	G	G	A	G	R	D	I	P	N1	
3626		Y	S	C	Q	C	A	P	P	E	S	G	S	R	C	E	L	-	-	Y	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	P	N2
6161		P	P	L	I	E	E	A	C	E	L	P	E	C	Q	E	D	A	G	N	K	V	C	S	L	Q	C	N	N	H	A	N1	
4646		P	S	T	P	P	A	T	C	L	S	Q	Y	C	A	D	K	A	R	D	G	V	C	D	E	A	C	N	S	H	A	N2	
9191		C	G	W	D	G	G	D	C	S	L	N	F	N	D	P	W	K	N	C	T	D	S	L	O	C	H	K	Y	E	S	N1	
7676		C	Q	W	D	F	F	D	C	S	L	T	H	E	N	D	P	W	A	N	C	S	S	P	L	P	C	H	D	Y	I	N	N2
1121		G	G	H	C	D	S	Q	C	N	S	A	G	C	L	F	D	G	F	D	C	Q	R	A	E	G	Q	C	M	P	L	N1	
1106		N	-	Q	C	D	E	L	C	H	T	V	E	C	L	F	D	H	F	E	C	Q	G	N	S	K	T	C	-	-	K	N2	
1151		Y	D	Q	Y	C	K	D	H	F	S	D	G	H	C	D	Q	G	C	N	S	A	E	C	E	W	D	G	L	D	C	N1	
1133		Y	D	K	Y	C	A	D	H	F	K	D	N	H	C	D	Q	G	C	N	S	E	E	C	G	W	D	G	L	D	C	N2	
1181		A	E	H	V	P	E	R	L	A	A	G	T	L	V	V	V	V	I	M	P	P	E	Q	L	R	N	S	S	E	R	N1	
1163		A	A	D	Q	P	E	R	L	A	E	G	T	L	V	I	V	V	L	M	P	P	E	Q	L	L	Q	U	A	R	S	N2	
2211		F	L	R	E	L	S	R	V	L	H	T	H	V	V	F	K	R	D	A	R	G	Q	Q	N	I	E	P	Y	Y	G	N1	
1193		F	L	R	A	L	G	T	L	L	H	T	H	L	R	I	K	R	D	S	Q	G	E	L	H	V	Y	P	Y	Y	G	N2	
2241		-	R	E	E	D	L	R	K	R	P	I	K	R	A	A	E	G	W	A	A	P	D	A	L	L	G	Q	V	K	A	N1	
2223		E	K	S	A	A	N	K	K	Q	R	N	T	R	R	S	L	P	-	G	E	D	E	Q	E	V	A	G	S	K	V	N2	
2200		S	E	L	P	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	E	G	G	R	R	R	R	E	L	D	P	M	N1			
2252		F	L	E	I	D	N	K	Q	C	V	Q	D	S	D	H	C	F	K	N	T	D	A	A	A	A	L	L	A	S	H	N2	
2289		D	V	R	G	S	I	V	Y	-	L	E	I	D	N	R	Q	C	V	Q	A	S	S	Q	C	F	Q	S	A	T	D	N1	
2282		A	I	Q	G	T	L	S	Y	P	L	V	S	V	V	S	E	S	L	T	P	E	R	T	-	-	Q	K	S	R	R	N2	
3318		V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	F	L	G	A	L	A	S	L	G	S	L	N	I	P	Y

FIG. 6A

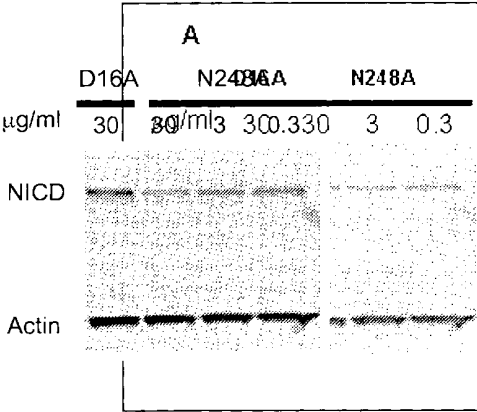
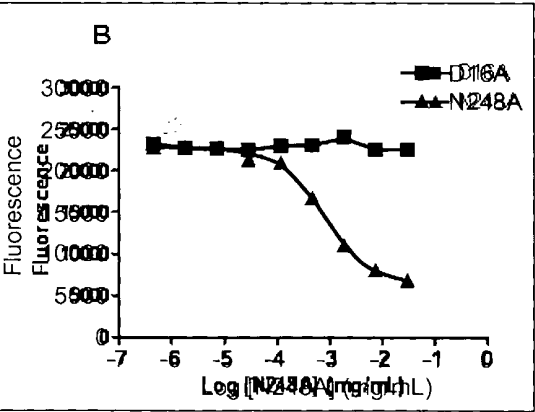


FIG. 6B



Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

WO 2010/14650

FIG. 7A

Relative fold difference of Hes1 mRNA

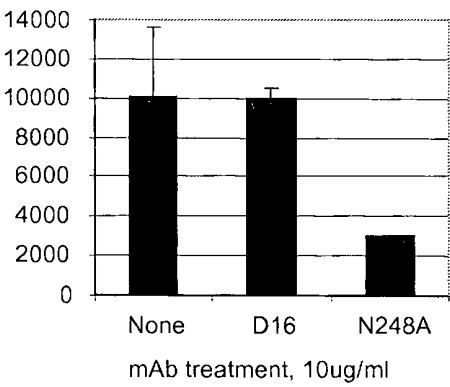
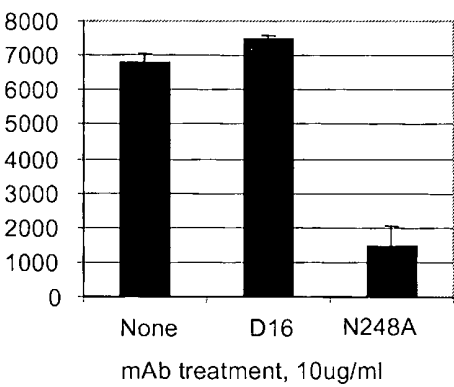


FIG. 7B

Relative fold difference of Hes4 mRNA

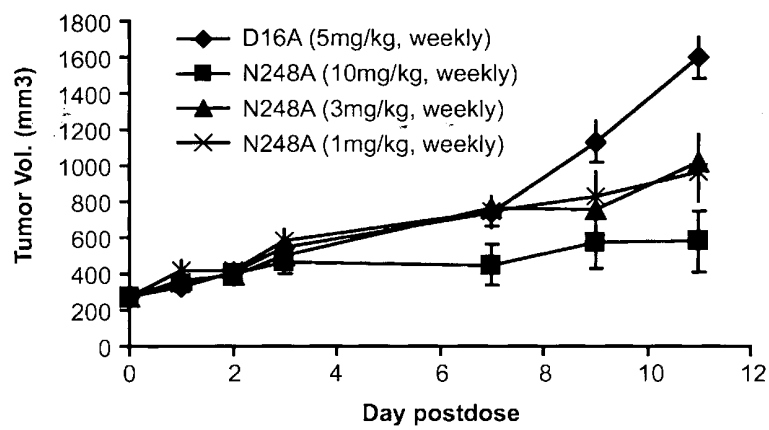


7/10

PCV/IB2010/052711

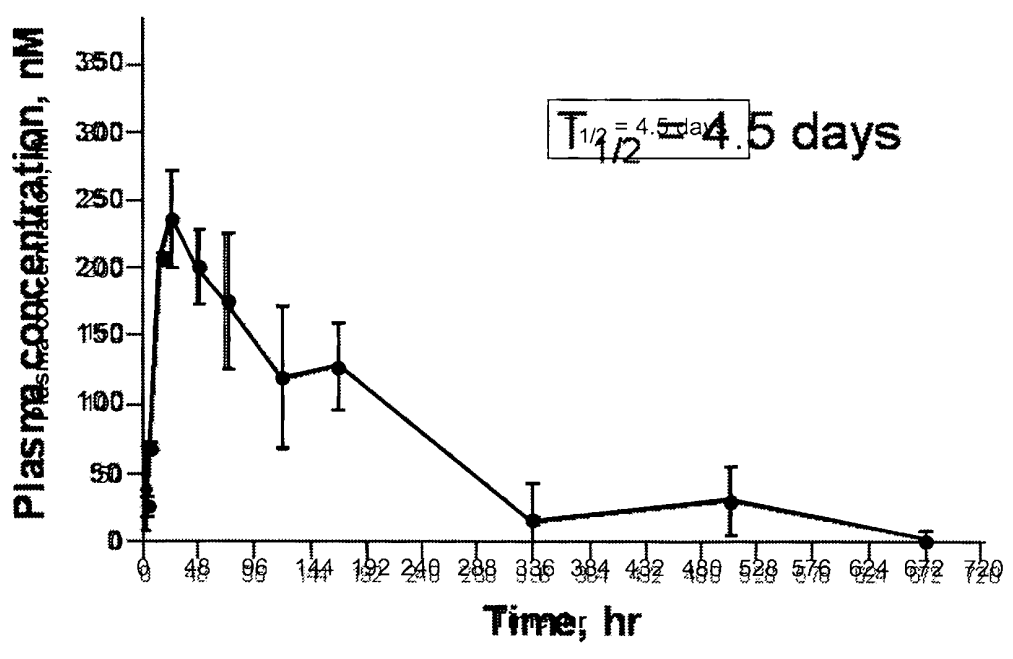
Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

FIG. 8



Dp (above diagonal) and V² (below diagonal)
of animals = 847, breed = CPRTC

FIG. 9

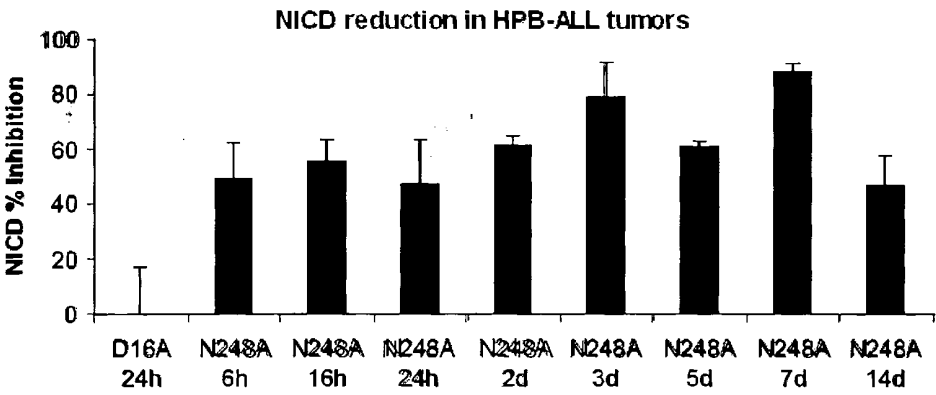


Dp (above diagonal) and V^2 (below diagonal)
of animals = 847 , breed = CPRTC

WO 2010/146550

FIG. 10

NICD reduction in HPB-ALL tumors



10/10

PCT/IB2010/052711

pctib2010052711-eolf-seq1
SEQUENCE LISTING

<10> Pfizer Inc.

<120> ANTI NOTCH-1 ANTIBODIES

<130> PC33897A

<150> 61/218,193

<151> 2009-06-18

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

atgccgccgc tcctggcacc tctgctctgc ctggcactgc tacccgctct cgctgcacga	60
gggccgcgat gctcccaacc aggtgagacc tgctgaatg gaggtaagtg tgaagcagcc	120
aatggcacgt gcctgtgcct gggcccttc acgggccccg aatgccagtt cccggccagc	180
agccccctgcc tgggcggcaa cccctgtac aaccagggga cctgtgagcc cacatccgag	240
agcccccttct accgttgctt gtgccccgcc aaattcaacg ggctcttggt ccacatcctg	300
gactacagct tcgggggtgg ggccggggcg gacatcccc cgccgctgat cgaggaggcg	360
tgcgagctgc ccgagtcca ggaggacgcg ggcaacaagg tctgcagcct gcagtgaac	420
aaccacgcgt gcggctggga cggcggtgac tgctccctca acttcaatga cccctggaag	480
aactgcacgc agtctctgca gtgctggaag tacttcagt acggccactg tgacagccag	540
tgcaactcag ccggctgcct cttcgacggc tttgactgcc agcgtgcgga aggccagtgc	600
aacccccctgt acgaccagta ctgcaaggac cacttcagcg acgggcactg cgaccagggc	660
tgcaacagcg cggagtgcga gtgggacggg ctggactgtg cggagcatgt acccgagagg	720
ctggcgggccg gcacgctggt ggtggtggtg ctgatgccgc cggagcagct gcgcaacagc	780
tccttccact tcctgcggga gctcagccgc gtgctgcaca ccaacgtggt cttcaagcgt	840
gacgcacacg gccagcagat gatcttcccc tactacggcc gcgaggagga gctgcgcaag	900
caccccatca agcgtgccgc cgagggtctg gccgcacctg acgccctgct gggccaggtg	960
aaggcctcgc tgctccctgg tggcagcgag ggtgggcggc ggccggaggga gctggacccc	1020
atggacgtcc gcggctccat cgtctacctg gagattgaca accggcagtg tgtgcaggcc	1080
tcctcgcagt gcttccagag tgccaccgac gtggccgcac tcctggggagc gctgcctcgc	1140
ctgggcagcc tcaacatccc ctacaagatc gagggcgtgc agagtgcagc cgtggagccg	1200
cccccgccgg cgcagaagcg ccggcgggcag catggccagc tctgggtccc tgagggcttc	1260
aaagtgtctg aggccagcaa gaagaagcgg cgggagcccc tcggcgagga ctccgtgggc	1320
ctcaagcccc tgaagaacgc ttcagac	1347

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

pctib2010052711-eolf-seq1

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

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

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

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

Pro Phe Thr Gly Pro Glu Cys Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Leu
50 55 60

Gly Gly Asn Pro Cys Tyr Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu
65 70 75 80

Ser Pro Phe Tyr Arg Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu
85 90 95

Cys His Ile Leu Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile
100 105 110

Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu
115 120 125

Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys
130 135 140

Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys
145 150 155 160

Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His
165 170 175

Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp
180 185 190

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

Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala
210 215 220

Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg
225 230 235 240

Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln
245 250 255

Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu
260 265 270

His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile

pctib2010052711-eolf-seq1
280 285

275
Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys
290 295 300
Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val
305 310 315 320
Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg
325 330 335
Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile
340 345 350
Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala
355 360 365
Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
370 375 380
Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro
385 390 395 400
Pro Pro Pro Ala Gln Lys Arg Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp Phe
405 410 415
Pro Glu Gly Phe Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg Arg Glu
420 425 430
Pro Leu Gly Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser
435 440 445

Asp

<210> 3
<211> 1287
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 3
atgcctccgc tccctggcacc tctgctctgc ctggcactgc tacccgctct cgctgcacga 60
gggccgcgat gctcccaacc aggtgagacc tgcctgaatg gaggtaagtg tgaagcagcc 120
aatggcacgt gcctgtgcct gggcccttc acgggccccg aatgccagtt cccggccagc 180
agccccctgcc tgggcggcaa cccctgctac aaccagggga cctgtgagcc cacatccgag 240
agcccccttct accgttgctt gtgccccgcc aaattcaacg ggctcttctg ccacatcctg 300
gactacagct tcgggggtgg ggccgggagc gacatcccc cgccgctgat cgaggaggcg 360
tgcgagctgc ccgagtgcc ggaggacgcg ggcaacaagg tctgcagcct gcagtgaac 420
aaccacgcgt gcggctggga cggcggtgac tgctccctca acttcaatga cccctggaag 480
aactgcacgc agtctctgca gtgctggaag tacttcagt acggccactg tgacagccag 540
tgcaactcag ccggctgcct ctgcgacggc ttgactgcc agcgtgcgga aggccagtgc 600

pctib2010052711-eolf-seq1

aacccccctgt acgaccagta ctgcaaggac cacttcagcg acgggcactg cgaccagggc 660
tgcaacagcg cggagtgcga gtgggacggg ctggactgtg cggagcatgt acccgagagg 720
ctggcgggccg gcacgctggt ggtggtggtg ctgatgccgc cggagcagct gcgcaacagc 780
tccttccact tcctgcggga gctcagccgc gtgctgcaca ccaacgtggt cttcaagcgt 840
gacgcacacg gccagcagat gatcttcccc tactacggcc gcgaggagga gctgcgcaag 900
caccatca agcgtgccgc cgagggtg gccgcacctg acgccctgct gggccaggtg 960
aaggcctcgc tgctccctgg tggcagcgag ggtgggcggc ggcggaggga gctggacccc 1020
atggacgtcc gcggctccat cgtctacctg gagattgaca accggcagtg tgtgcaggcc 1080
tcctgcagtg gcttccagag tgccaccgac gtggccgcat tcctgggagc gctgcctcg 1140
ctgggcagcc tcaacatccc ctacaagatc gaggccgtgc agagtgcagc cgtggagccg 1200
ccccgccgg cgcagctgca cttcatgtac gtggcggcgg ccgcctttgt gcttctgttc 1260
ttcgtgggct gcggggtgct gctgtcc 1287

<210> 4
<211> 429
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 4

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

pctib2010052711-eolf-seql

Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His
165 170 175
Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp
180 185 190
Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys
195 200 205
Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala
210 215 220
Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg
225 230 235 240
Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln
245 250 255
Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu
260 265 270
His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile
275 280 285
Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys
290 295 300
Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val
305 310 315 320
Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg
325 330 335
Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile
340 345 350
Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala
355 360 365
Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
370 375 380
Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro
385 390 395 400
Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe
405 410 415
Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser
420 425

<210> 5
<211> 363
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 5

pctib2010052711-eolf-seq1
cagggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt aactactgga tggagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaaggggtag aactaactac 180
aatgagaact tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagtctac 240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagattccac 300
agctcggcct attactatac tatggactac tgggggtcaaa gaacctcggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 6
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe His Ser Ser Ala Tyr Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Arg Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 327
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 7

caggctgttg tgactcagga atctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc 60
acttgtcgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaaactg ggtccaagaa 120
aaaccagatc atttattcac tgggtctaata ggtggtacca acaaccgagc tccaggtatt 180
cctgccagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg cctcaccat cacaggggca 240
cagactgagg atgaggcaat atatttctgt gctctatggg acagcaacca ctgggtgttc 300
ggtggaggaa ccaaactgac tgtccta 327

<210> 8
<211> 109

pctib2010052711-eolf-seq1

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Ile Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 9
<211> 42
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 9
cgctcaagta ctggggctgt tacaactagt aactatgccac ac 42

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 10
ggtaccaaca accgagctcc a 21

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 11
gctctatggt acagcaacca ctgggtg 27

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12
Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

pctib2010052711-eolf-seq1

<400> 13

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 15

<211> 15

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

aactactgga tggag

15

<210> 16

<211> 51

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

gagattttac ctggaagggg tagaactaac tacaatgaga acttcaaggg c

51

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

ttccacagct cggcctatta ctatactatg gactac

36

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Asn Tyr Trp Met Glu
1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

pctib2010052711-eolf-seq1

<400> 20

Phe His Ser Ser Ala Tyr Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 21

<211> 864

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gaggaggcgt gcgagctgcc cgagtgccag gaggacgcgg gcaacaaggt ctgcagcctg 60
cagtgaaca accacgcgtg cggtctgggac ggcggtgact gctccctcaa cttcaatgac 120
ccctggaaga actgcacgca gtctctgcag tgctggaagt acttcagtga cggccactgt 180
gacagccagt gcaactcagc cggtgcctc ttcgacggct ttgactgcca gcgtgcggaa 240
ggccagtgca accccctgta cgaccagtac tgcaaggacc acttcagcga cgggcactgc 300
gaccagggct gcaacagcgc ggagtgcgag tgggacgggc tggactgtgc ggagcatgta 360
cccagagggc tggcgggccgg cacgctgggtg gtggtgggtgc tgatgccgcc ggagcagctg 420
cgcaacagct ccttccactt cctgcgggag ctcagccgcg tgctgcacac caacgtggtc 480
ttcaagcgtg acgcacacgg ccagcagatg atcttccccct actacggccg cgaggaggag 540
ctgcgcaagc accccatcaa gcgtgccgcc gagggtctggg ccgcacctga cgccctgctg 600
ggccaggtga aggcctcgct gctccctggt ggcagcgagg gtgggcggcg gcggaggagg 660
ctggacccca tggacgtccg cggtccatc gtctacctgg agattgacaa ccggcagtgt 720
gtgcaggcct cctcgcagtg cttccagagt gccaccgacg tggccgcatt cctgggagcg 780
ctgcctcgc tgggcagcct caacatcccc tacaagatcg aggccgtgca gagtgagacc 840
gtggagccgc ccccgccggc gcag 864

<210> 22

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

pctib2010052711-eolf-seq1

Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp
 100 105 110

Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser
 130 135 140

Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val
 145 150 155 160

Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly
 165 170 175

Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly
 180 185 190

Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu
 195 200 205

Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met
 210 215 220

Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys
 225 230 235 240

Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala
 245 250 255

Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys
 260 265 270

Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln
 275 280 285

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference PC33897A	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/IB2010/052711	International filing date (<i>day/month/year</i>) 16 June 2010 (16.06.2010)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 18 June 2009 (18.06.2009)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant PFIZER 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 44bis.3(c) and 93bis.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 44bis .2).

	Date of issuance of this report 20 December 2011 (20.12.2011)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Cécile Chatel
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: ro.ib@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing

(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.
PCT/IB2010/052711

International filing date (day/month/year)
16.06.2010

Priority date (day/month/year)
18.06.2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 C07K16/32

Applicant
PFIZER 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 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and 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 usually 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 66.1bis(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:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Fellows, Edward

Telephone No. +49 89 2399-7460



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/IB2010/052711

Box No. I Basis of the 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 43bis.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:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/B2010/052711

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-31</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-31</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-31</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2010/052711

1 Concerning section I

Sequence ID numbers 1-22 are also included in the basis of this written opinion.

2 Concerning section V

Reference is made to the following documents:

- D1 LI KANG ET AL: "Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 12, March 2008 (2008-03) ; pages 8046-8054, XP002599615 ISSN: 0021-9258
- D2 KIPRIYANOV S M ET AL: "Generation and production of engineered antibodies" MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US LNKD- DOI:10.1385/MB:26:1:39, vol. 26, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01) ; pages 39-60, XP009044299 ISSN: 1073-6085

Novelty and inventive step (Articles 33(1), 33(2) and 33(3) PCT)

Novelty

- 2.1 None of the prior-art documents mentioned above disclose the subject-matter of **claims 1--31**. Therefore, said claims appear to fulfill the requirements of Articles 33(1) and 33(2) PCT.

Inventive step

Claims 1-31 appear to lack inventive step for the following reasons:

- 2.2 **D1** is considered the closest prior art for **claims 1, 2, 6, 30 and 31**.
Document **D1** discloses antagonist anti-Notch-3 chimeric antibodies of the IgG1 subclass, namely A4 and A8 (cf. figures 1, 4 and 6). Said antibodies inhibit the proteolytic cleavage of the mammalian Notch-3 receptor through clamping "LNR1" of the Lin12/Notch repeats (LNR domain), which contains 3 repeats (LNR1-3), and "HD2" of the heterodimerization (HD) domain, which is divided into N- (HD1) and C-terminals (HD2) halves by a cleavage at site S1

(cf. figures 1 and 4, especially figure 4a, antibodies A4 and A8). **D1** describes therefore antibodies able to bind specifically to two distinct epitopes on Notch-3.

- 2.3 The difference in terms of technical features between the subject-matter of **claims 1, 2, 6, 30 and 31** and **D1** is an antibody that specifically binds to the Lin-A and HD-C domains of human Notch-1. The technical effect caused by this difference is the inhibition of the Notch-1 signalling pathway. Thus, taking **D1** as the closest prior art, the objective technical problem to be solved can be seen as the provision of an antagonist antibody that specifically inhibits Notch-1 signalling. The solution to said objective technical problem, i.e. the subject-matter of **claims 1, 2, 6, 30 and 31**, is not considered inventive for the following reasons:

Document **D1** already suggests that Notch receptors, such as Notch-3 and Notch-1, are implicated in various human cancers such as leukemia (cf. page 8046, last paragraph, lines 12-22). **D1** also suggests that it should be possible to develop antibodies, similar to those that inhibit Notch-3 (cf. point 2.2), that would selectively modulate the activities of Notch-1, -2 or -4. Aware of the teachings of **D1**, and looking to solve the problem posed, the skilled person, without need of inventive skill, would not only try to develop antibodies that prevent the proteolytic cleavage of human Notch-1 by binding both "Lin-A" and "HD-C" domains but would also, as demonstrated in **D1**, test such antibodies for their ability, for example, to inhibit Notch-1 activation and associated downstream regulated signalling molecules as well as their ability to stunt cell proliferation. Additionally, the skilled person would thereafter be motivated to test the therapeutic impact of such anti-Notch-1 antibodies on tumours in which Notch-1 activity is upregulated.

Therefore, inventive step cannot be acknowledged for **claims 1, 2, 6, 30 and 31** (Articles 33(1) and 33(3) PCT).

- 2.4 A similar reasoning, as that raised under point 2.2 and 2.3 herein above, appears to apply mutatis mutandis to **claims 9-17** in view of document **D1**. It is also noted that the antibodies of **claims 9-17** correspond to the selection of specific antibodies which cannot be considered as forming a basis for inventive step acknowledgment. Therefore, said claims do not meet the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2010/052711

Moreover, **Claims 9-14** refer to isolated monoclonal antibodies, or fragment thereof, that specifically binds to human Notch-1 defined 1) solely by the three CDRs of its heavy chain (i.e. SEQ ID Nos. 18-20 respectively; with reference to **claims 9-11**) or 2) only by the three CDRs of its light chain (i.e. SEQ ID Nos. 12-14 respectively; with reference to **claims 12-14**).

Since it is commonly accepted in the art that an antibody must comprise all 6 CDRs in order to maintain its antigen binding specificity and affinity and therefore its functional properties, e.g. antagonist activity, the antibodies defined in said claims, i.e., antagonist anti-Notch-1 antibodies, do not contain the essential characteristic features necessary to bind to their target and perform their antagonistic activities. Thus, the problem posed is not considered to be solved over the entire scope of the claims.

- 2.5 In view of the prior-art documents at hand, **claims 3-5, 7, 8 and 18-29** do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT with respect to inventive step since these additional features appear conventional and do not result in any unexpected technical effect (Articles 33(1) and 33(3) PCT).

For instance:

- **Claims 3 and 4** refer to amino acids required for binding of the antibody of **claims 1 and 2** to the first (LinA) and second (HD-C) epitopes; **claim 5**, referring to amino acids of the LinA epitope that, following a non conservative substitution, cause more than an 80% loss of binding to Notch-1.

Document **D1** discloses antagonist anti-Notch-3 antibodies which recognise the LinA and HD-C epitopes and performs epitope mapping experiments which pinpoint amino acid required for efficient binding to both epitopes (cf. **D1**, table 1 and 2, page 8052). For example, table 1 shows a list of substitutions allowing the determination of amino acids, i.e. Asp1402 and Glu1404 that are essential for binding of anti-Notch-3 antibody A4. Aware of the teaching of **D1** and of the argumentation put forth in point 2.2, the skilled person would try, without need of inventive skill and with methods well known in the art, to determine the amino acids required for maximum binding in selected antagonist anti-Notch-1 antibodies directed towards LinA and HD-C epitopes.

Therefore, **claims 3-5** do not meet the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.

- Furthermore, the production of monoclonal antibodies, e.g. mouse, chimeric or humanized antibodies of the IgG1 subclass, from a known target and the selection therefrom of antibodies having particular characteristics, e.g. antagonistic antibodies having desirable binding affinities (K_D), is considered common laboratory practice in the field of antibody technology (as reviewed in **D2**). The skilled person would thereafter be motivated to use such antibodies as part of a pharmaceutical composition for the treatment of diseases, such as cancer (as already suggested in **D1**, page (cf. page 8046, last paragraph, lines 12-22; relevant for **claims 7, 8 and 18-29**).

3 Further remarks

Claim 30 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Patentability, in particular novelty and inventive step of said claims has been assessed on the basis of a purpose-limited product taking into account the alleged effects of the substance or composition.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: _____

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/IB2010/052711

International filing date (day/month/year)
16.06.2010

Priority date (day/month/year)
18.06.2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 C07K16/32

Applicant
PFIZER 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 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and 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 usually 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 66.1bis(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:

 European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Fellows, Edward

Telephone No. +49 89 2399-7460



1 **Concerning section I**

Sequence ID numbers 1-22 are also included in the basis of this written opinion.

2 **Concerning section V**

Reference is made to the following documents:

- D1 LI KANG ET AL: "Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 12, March 2008 (2008-03) ; pages 8046-8054, XP002599615 ISSN: 0021-9258
- D2 KIPRIYANOV S M ET AL: "Generation and production of engineered antibodies" MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US LNKD- DOI:10.1385/MB:26:1:39, vol. 26, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01) ; pages 39-60, XP009044299 ISSN: 1073-6085

Novelty and inventive step (Articles 33(1), 33(2) and 33(3) PCT)

Novelty

- 2.1 None of the prior-art documents mentioned above disclose the subject-matter of **claims 1--31**. Therefore, said claims appear to fulfill the requirements of Articles 33(1) and 33(2) PCT.

Inventive step

Claims 1-31 appear to lack inventive step for the following reasons:

- 2.2 **D1** is considered the closest prior art for **claims 1, 2, 6, 30 and 31**.

Document **D1** discloses antagonist anti-Notch-3 chimeric antibodies of the IgG1 subclass, namely A4 and A8 (cf. figures 1, 4 and 6). Said antibodies inhibit the proteolytic cleavage of the mammalian Notch-3 receptor through clamping "LNR1" of the Lin12/Notch repeats (LNR domain), which contains 3 repeats (LNR1-3), and "HD2" of the heterodimerization (HD) domain, which is divided into N- (HD1) and C-terminals (HD2) halves by a cleavage at site S1

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/IB2010/052711

(cf. figures 1 and 4, especially figure 4a, antibodies A4 and A8). **D1** describes therefore antibodies able to bind specifically to two distinct epitopes on Notch-3.

- 2.3 The difference in terms of technical features between the subject-matter of **claims 1, 2, 6, 30 and 31** and **D1** is an antibody that specifically binds to the Lin-A and HD-C domains of human Notch-1. The technical effect caused by this difference is the inhibition of the Notch-1 signalling pathway. Thus, taking **D1** as the closest prior art, the objective technical problem to be solved can be seen as the provision of an antagonist antibody that specifically inhibits Notch-1 signalling. The solution to said objective technical problem, i.e. the subject-matter of **claims 1, 2, 6, 30 and 31**, is not considered inventive for the following reasons:

Document **D1** already suggests that Notch receptors, such as Notch-3 and Notch-1, are implicated in various human cancers such as leukemia (cf. page 8046, last paragraph, lines 12-22). **D1** also suggests that it should be possible to develop antibodies, similar to those that inhibit Notch-3 (cf. point 2.2), that would selectively modulate the activities of Notch-1, -2 or -4. Aware of the teachings of **D1**, and looking to solve the problem posed, the skilled person, without need of inventive skill, would not only try to develop antibodies that prevent the proteolytic cleavage of human Notch-1 by binding both "Lin-A" and "HD-C" domains but would also, as demonstrated in **D1**, test such antibodies for their ability, for example, to inhibit Notch-1 activation and associated downstream regulated signalling molecules as well as their ability to stunt cell proliferation. Additionally, the skilled person would thereafter be motivated to test the therapeutic impact of such anti-Notch-1 antibodies on tumours in which Notch-1 activity is upregulated.

Therefore, inventive step cannot be acknowledged for **claims 1, 2, 6, 30 and 31** (Articles 33(1) and 33(3) PCT).

- 2.4 A similar reasoning, as that raised under point 2.2 and 2.3 herein above, appears to apply mutatis mutandis to **claims 9-17** in view of document **D1**. It is also noted that the antibodies of **claims 9-17** correspond to the selection of specific antibodies which cannot be considered as forming a basis for inventive step acknowledgment. Therefore, said claims do not meet the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.

Moreover, **Claims 9-14** refer to isolated monoclonal antibodies, or fragment thereof, that specifically binds to human Notch-1 defined 1) solely by the three CDRs of its heavy chain (i.e. SEQ ID Nos. 18-20 respectively; with reference to **claims 9-11**) or 2) only by the three CDRs of its light chain (i.e. SEQ ID Nos. 12-14 respectively; with reference to **claims 12-14**).

Since it is commonly accepted in the art that an antibody must comprise all 6 CDRs in order to maintain its antigen binding specificity and affinity and therefore its functional properties, e.g. antagonist activity, the antibodies defined in said claims, i.e., antagonist anti-Notch-1 antibodies, do not contain the essential characteristic features necessary to bind to their target and perform their antagonistic activities. Thus, the problem posed is not considered to be solved over the entire scope of the claims.

- 2.5 In view of the prior-art documents at hand, **claims 3-5, 7, 8 and 18-29** do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT with respect to inventive step since these additional features appear conventional and do not result in any unexpected technical effect (Articles 33 (1) and 33(3) PCT).

For instance:

- **Claims 3 and 4** refer to amino acids required for binding of the antibody of **claims 1 and 2** to the first (LinA) and second (HD-C) epitopes; **claim 5**, referring to amino acids of the LinA epitope that, following a non conservative substitution, cause more than an 80% loss of binding to Notch-1.

Document **D1** discloses antagonist anti-Notch-3 antibodies which recognise the LinA and HD-C epitopes and performs epitope mapping experiments which pinpoint amino acid required for efficient binding to both epitopes (cf. **D1**, table 1 and 2, page 8052). For example, table 1 shows a list of substitutions allowing the determination of amino acids, i.e. Asp1402 and Glu1404 that are essential for binding of anti-Notch-3 antibody A4. Aware of the teaching of **D1** and of the argumentation put forth in point 2.2, the skilled person would try, without need of inventive skill and with methods well known in the art, to determine the amino acids required for maximum binding in selected antagonist anti-Notch-1 antibodies directed towards LinA and HD-C epitopes.

Therefore, **claims 3-5** do not meet the requirements of Articles 33(1) and 33 (3) PCT.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2010/052711

- Furthermore, the production of monoclonal antibodies, e.g. mouse, chimeric or humanized antibodies of the IgG1 subclass, from a known target and the selection therefrom of antibodies having particular characteristics, e.g. antagonistic antibodies having desirable binding affinities (K_D), is considered common laboratory practice in the field of antibody technology (as reviewed in **D2**). The skilled person would thereafter be motivated to use such antibodies as part of a pharmaceutical composition for the treatment of diseases, such as cancer (as already suggested in **D1**, page (cf. page 8046, last paragraph, lines 12-22; relevant for **claims 7, 8 and 18-29**).

3 Further remarks

Claim 30 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Patentability, in particular novelty and inventive step of said claims has been assessed on the basis of a purpose-limited product taking into account the alleged effects of the substance or composition.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC33897A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2010/052711	International filing date (day/month/year) 16/06/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 18/06/2009
Applicant PFIZER INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out 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))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

- ☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2010/052711

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - 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 purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto 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/IB2010/052711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K16/32 ADD.		
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) C07K 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI KANG ET AL: "Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 12, March 2008 (2008-03), pages 8046-8054, XP002599615 ISSN: 0021-9258	1-6, 9-17,30, 31
Y	figures 1-8 page 8046, line 12 - line 22, last paragraph page 8053, line 33 - page 8054, line 11 ----- -/--	7,8, 18-29
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* 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 document 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. "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 September 2010		Date of mailing of the international search report 19/10/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fellows, Edward

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2010/052711

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIPRIYANOV S M ET AL: "Generation and production of engineered antibodies" MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US LNKD- DOI:10.1385/MB:26:1:39, vol. 26, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 39-60, XP009044299 ISSN: 1073-6085 the whole document	7,8, 18-29

1 **Concerning section I**

Sequence ID numbers 1-22 are also included in the basis of this written opinion.

2 **Concerning section V**

Reference is made to the following documents:

- D1 LI KANG ET AL: "Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 12, March 2008 (2008-03), pages 8046-8054, XP002599615 ISSN: 0021-9258
- D2 KIPRIYANOV S M ET AL: "Generation and production of engineered antibodies" MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US LNKD- DOI:10.1385/MB:26:1:39, vol. 26, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 39-60, XP009044299 ISSN: 1073-6085

Novelty and inventive step (Articles 33(1), 33(2) and 33(3) PCT)

Novelty

- 2.1 None of the prior-art documents mentioned above disclose the subject-matter of **claims 1-31**. Therefore, said claims appear to fulfill the requirements of Articles 33(1) and 33(2) PCT.

Inventive step

Claims 1-31 appear to lack inventive step for the following reasons:

- 2.2 **D1** is considered the closest prior art for **claims 1, 2, 6, 30 and 31**.

Document **D1** discloses antagonist anti-Notch-3 chimeric antibodies of the IgG1 subclass, namely A4 and A8 (cf. figures 1, 4 and 6). Said antibodies inhibit the proteolytic cleavage of the mammalian Notch-3 receptor through clamping "LNR1" of the Lin12/Notch repeats (LNR domain), which contains 3 repeats (LNR1-3), and "HD2" of the heterodimerization (HD) domain, which is divided into N- (HD1) and C-terminals (HD2) halves by a cleavage at site S1

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2010/052711

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-31</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-31</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-31</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 11-177186- -00000-0000

Fecha: 2011-12-22 17:17:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	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 INVENCION 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 ☐