

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-158445- -00006-0000

Fecha: 2015-01-30 16:25:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE(YII) Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 24

Carlos R. Olarte
Juan G. Mo

Alexander Agu
Carlos A. F
Juan F. Ac
Andrés Rur
Mónica Gue
Andrés Alva
María C. Cald
Mauricio J
José J. Dang
Gina Cár
Isabella Her
Zaava R
Alejandro M
Miguel F. Pe
Catalina Ar
Laura M. Esc
Lorena And
Sergio Arbo
Catalina Jim
Daniela Gonz
Maritza S
Gina A. J
Guillermo F

Mea
María C. Mú
Eddie Man
Adrián Santan
Maritza P.
Camilo A. Be

Barranq
Gina de Eche

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente N° 13-158.445

Solicitud de Patente de Invención titulada: "ANTICUERPOS ANTI-NOTCH1"

Solicitante: WYETH LLC

Nuestra Ref.: P2013/000105

RESPUESTA AL OFICIO No. 11974, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 038

DE FECHA 23 DE SEPTIEMBRE DE 2014

(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal de prórroga previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. a- En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la presente solicitud, me permito adjuntar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio presentado el 24 de octubre de 2013.

Así las cosas, el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto contiene los siguientes cambios:

- se eliminaron las Reivindicaciones 1, 6, 12, 13 y 19;
- en las regiones variables de cadena pesada y ligera de la nueva Reivindicación 2 (antigua Reivindicación 3) se incluyeron las secuencias que se encontraban en la antigua Reivindicación 1;
- se eliminó el lenguaje relacionado con homología de las nuevas Reivindicaciones 2, 3, 6 y 7 (antiguas Reivindicaciones 3, 4, 8 y 9);

- en la región variable de cadena ligera de la nueva Reivindicación 6 (antigua Reivindicación 8) se incluyeron las secuencias que se encontraban en la antigua Reivindicación 6;
- se eliminaron varios de los aminoácidos que describen el epítipo al que se unen los anticuerpos de las nuevas Reivindicaciones 4 y 8;
- la nueva Reivindicación 9 (antigua Reivindicación 11) ahora depende de la nueva Reivindicación 5 (antigua Reivindicación 7);
- se corrigió la traducción de la nueva Reivindicación 9, de acuerdo con la Reivindicación 39 original;
- se modificó la redacción de la nueva Reivindicación 10 (antigua Reivindicación 14) de tal forma que ésta especifica que el anticuerpo pertenece a la subclase IgG1;
- se corrigió un error de redacción en la nueva Reivindicación 12 (antigua Reivindicación 16) en tanto esta ahora lee “*un ácido nucleico que comprende una secuencia (...)*” y no “*un ácido nucleico que una secuencia (...)*”;
- las demás reivindicaciones, así como sus relaciones de dependencia fueron modificadas de acuerdo a los cambios anteriormente mencionados.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial. Por el contrario, éstas corresponden a una limitación de la materia reivindicada.

b- Adicionalmente, anexo al presente memorial hojas sustitutas 4, 52, 74, 75, 78, 84, 98, 108 y 113 en donde se corrigieron errores tipográficos provenientes de la Solicitud Internacional.

2. a- El Examinador considera que el Capítulo Reivindicatorio no es claro ni conciso por las siguientes razones:

- la Reivindicación 1 no define el anticuerpo en términos de sus características estructurales, es decir, mediante las secuencias que definen las CDR;
- las Reivindicaciones 3, 4, 8 y 9 incluyen lenguaje de homología que no encuentra sustento en el Capítulo Descriptivo;
- las Reivindicaciones 5, 10, 11 y 12 reclaman resultados a alcanzar, lo que no define los anticuerpos de la presente invención mediante características estructurales;
- la Reivindicación 12 define al anticuerpo mediante lenguaje funcional y no mediante sus características estructurales;

- la Reivindicación 13 menciona las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 que no encuentran soporte en el Capítulo Descriptivo sino sólo para IgG1;
- los ácidos nucleicos de la Reivindicación 15 debe estar definidos mediante las secuencias completas que codifican para el anticuerpo;
- el vector de la Reivindicación 17 debería estar definido por su tipo y la secuencia recombinante que contiene;
- la Reivindicación 19 reclama un método que no está claramente definido por una secuencia lógica de etapas;
- las células de las Reivindicaciones 18 y 20 no encuentran soporte en el Capítulo Descriptivo y éstas deberían estar definidas por la línea celular a la que corresponden de tal forma que se especifique su tipo y origen.

b- i) En primer lugar, llamo respetuosamente la atención del Examinador sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, tal y como lo señalé en el numeral 1 del presente memorial. A la luz de dichas modificaciones, considero superadas las objeciones relacionadas con las Reivindicaciones 1, 6, 12, 13 y 19 en vista de que éstas fueron eliminadas. En este mismo orden de ideas, considero superada la objeción del Examinador sobre lenguaje de homología en las Reivindicaciones 2, 3, 6 y 7 (antiguas Reivindicaciones 3, 4, 8 y 9) pues éste fue retirado de las mismas.

De acuerdo con las modificaciones realizadas, la presente invención reclama protección sobre un anticuerpo que se une a Notch1, el cual está definido estructuralmente mediante las 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadenas pesada y ligera, es decir, mediante las 6CDRs características. Teniendo en cuenta lo anterior, considero superadas las objeciones del Examinador respecto a la falta de caracterización del anticuerpo reclamado, pues la nueva Reivindicación 1 (antigua Reivindicación 2) proporciona todos los elementos característicos del anticuerpo reclamado de manera clara para que éste sea fácilmente comparado con el arte previo.

ii) Ahora bien, respecto a las objeciones del Examinador sobre los resultados a alcanzar que se reclaman en las Reivindicaciones 4, 8 y 9, me permito llamar respetuosamente su atención sobre el hecho que los resultados a alcanzar son perfectamente válidos bajo los lineamientos del Manual Andino de Patentes (MAP) y la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC (en adelante, la Guía de la SIC):

“Como se menciona anteriormente, las reivindicaciones deben definir la invención por sus características esenciales, estructurales o funcionales. No

se admite que la reivindicación defina la invención por el resultado a alcanzar (del tipo: “Aparato de destilación caracterizado porque tiene un rendimiento del 99%”), puesto que en realidad equivaldría a definir el problema técnico a resolver y el alcance de la reivindicación incluiría no solo la solución propuesta por el solicitante sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.

El resultado a alcanzar no es una característica técnica de la invención. Puede aparecer en la reivindicación, pero siempre acompañado las (sic) características técnicas que definen la invención”^{1,2}, (énfasis fuera de texto)

Ambos documentos establecen que un resultado a alcanzar se aceptará en un pliego de reivindicaciones si éste incluye a su vez las características técnicas esenciales que definen la invención. En el presente caso, las Reivindicaciones 4, 8 y 9 (antiguas Reivindicaciones 5, 10 y 11) son dependientes de las nuevas Reivindicaciones 1 y 5, respectivamente, las cuales definen estructuralmente los anticuerpos de la presente invención mediante las secuencias de aminoácidos que conforman las 6 CDRs de las regiones variables de cadenas pesada y ligera.

Teniendo en cuenta que una reivindicación dependiente según el MAP, es aquella que “hace referencia a una anterior y **contiene todas** las características de aquella”³ en donde “la expresión “caracterizado por” debe entenderse como “caracterizado **además** por”⁴, y que como ejemplo el mismo MAP establece que “si la reivindicación 3 depende de la 2 y ésta de la 1, la reivindicación 3 es la suma de las características de la 1 más la 2 más la 3, ya que por sí sola no tendría significado”⁵, en el presente caso, los anticuerpos de la Reivindicación 4 contiene **todas las características** de la Reivindicación 1 al depender de ella, y las Reivindicaciones 8 y 9 contienen **todas las características** de la Reivindicación 5 al depender de ellas.

Así, las Reivindicaciones 4, 8 y 9, que reclaman “resultados a alcanzar”, **no requieren** la inclusión de las características estructurales de los anticuerpos, porque al depender de las Reivindicaciones 1 y 5 que definen los anticuerpos por su estructura, por definición también incluyen tales características estructurales, cumpliendo con los requisitos del Manual Andino de Patentes y la Guía de la SIC. Lo anterior significa que los resultados reclamados en las

¹ Manual Andino de Patentes. (2004). Sección 4.6.6 (disponible en <http://www.comunidadandina.org/public/patentes.pdf>).

² Guía para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de Utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio (2014). Sección 2.6.5.8 Reivindicaciones definidas por el resultado a alcanzar.

³ Ibídem. Sección 4.5.2, página 37.

⁴ Ibídem.

⁵ Ibídem.

Reivindicaciones 4, 8 y 9 son alcanzados únicamente por los anticuerpos definidos estructuralmente en las Reivindicaciones 1 y 5, por lo que no existe duda sobre la estructura de los mismos.

iii) Con respecto a las Reivindicaciones 11 a 15 (antiguas Reivindicaciones 15, 17, 18 y 20) que reclaman un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, un vector que comprende dicho ácido nucleico, la célula que comprende dicho vector y la célula que produce recombinantemente el anticuerpo, me permito llamar la atención del Examinador sobre el hecho que un inventor está en su derecho de reclamar protección para la totalidad de un concepto inventivo desarrollado, sin importar la amplitud de éste, siempre y cuando se conserve el principio de unidad de invención y no haya arte previo que afecte su patentabilidad. Es decir, un Capítulo Reivindicatorio puede ser tan amplio como se requiera para así poder enmarcar la totalidad del concepto inventivo desarrollado y todas sus posibles modalidades, más no solamente las modalidades preferidas o específicamente ejemplificadas en dicha solicitud.

En el presente caso, el concepto inventivo desarrollado por el inventor corresponde a los anticuerpos de las Reivindicaciones 1 a 5, y dicho concepto inventivo comprende adicionalmente los ácidos nucleicos que codifican para dichos anticuerpos, los vectores que comprenden dicho ácido nucleico y las células hospederas que comprenden dicho vector y producen recombinantemente dicho anticuerpo (cualquier ácido nucleico, vector o célula hospedera). De hecho, la posibilidad de obtener la invención en diversas modalidades, es una práctica aceptada a nivel mundial en el ámbito de las patentes, ya que como el Examinador debe saberlo, una patente de invención no se limita a una única modalidad, si no que cubre un concepto inventivo global que abarca diferentes modalidades (diversas materializaciones de la invención) ligadas por un efecto técnico común que finalmente delimita el alcance de la invención, que en este caso corresponde los anticuerpos reclamados mediante sus características estructurales.

Adicionalmente, es importante señalar que la persona medianamente versada en la materia está en capacidad de determinar según su conocimiento en el arte qué secuencia de ácidos nucleicos codificarían para los anticuerpos reclamados mediante las secuencias específicas, así como el vector que lo comprendería y la línea celular que esté en capacidad para poder albergar dicho vector y que ésta pudiese producir de forma recombinante el anticuerpo de la presente invención.

Teniendo en cuenta lo anterior, considero respetuosamente que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con los requisitos de claridad y concisión establecidos en la Decisión 486, y a la luz del Manual Andino de Patentes (MAP) y la Guía de la SIC, permitiéndole a la

persona medianamente versada en la materia comprender inequívocamente el alcance de la materia reclamada.

3. a- El Examinador señala que la patente US2009/0081238 (D1) y el artículo “*Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors*”⁶ (D2) afectan el nivel inventivo de la presente invención.

El Examinador argumenta que D1 y D2 son el arte previo más cercano a la Reivindicación 1 en tanto éstos describen procedimientos para proporcionar anticuerpos anti-Notch que se unen a la región reguladora negativa (NRR). El Examinador reconoce que la diferencia entre la presente invención y el arte previo recae sobre las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadenas pesada y ligera que caracterizan el anticuerpo que se une a NRR. Sin embargo, el Examinador asegura que dicha diferencia no le confiere a la presente invención un resultado mejorado.

En consecuencia, para el Examinador el problema técnico que resuelve la presente invención es: “*buscar un anticuerpo capaz de unirse a Notch1 alternativo a lo que se encuentra reflejado en el estado de la técnica, para ser empleando (sic) como un medicamento en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de enfermedades particulares asociadas con algunos tipos de cáncer, procedimiento conocido en los documentos D1 y D2 para (conseguir el efecto técnico que la invención proporciona) hacerlo más eficiente.*”⁷

Particularmente, el Examinador señala que D1 enseña anticuerpos anti-Notch1 NRR aislados que se unen a Notch1 NRR con una constante de disociación (K_d) del orden 1×10^{-7} o de mayor afinidad. D1 también enseña ácidos nucleicos que codifican para dichos anticuerpos así como vectores y células que los comprende. Además, D2 sugiere un proceso para proveer un anticuerpo que se une a Notch1, causando así la inhibición del crecimiento de tumores, por lo que el Examinador considera que la presente invención se limita a proveer anticuerpos anti-Notch1 alternativos y obvios a partir del procedimiento en D2. El Examinador concluye que la persona medianamente versada en la materia utilizaría la metodología divulgada en D1 en el procedimiento de D2 para así llegar al objeto de la presente invención, por lo que se considera obvia.

b- En primer lugar, con el fin de demostrar el nivel inventivo de la nueva Reivindicación 1, me permito resaltar que de acuerdo con la Guía de la SIC, este análisis se debe

⁶ Yan Wu, et al. (2010). Therapeutic Antibody Targeting of Individual Notch Receptors. *Nature*, 464(7291), 1052-1057. doi:10.1038/nature08878.

⁷ Oficio No. 11794, notificado por fijación en lista No. 038 del 23 de septiembre de 2014, página 5, primer párrafo.

desarrollar mediante un estudio objetivo del arte previo, sin influencia del conocimiento que ya se tiene por parte de la invención que se pretende evaluar⁸. Con el fin de minimizar ese riesgo, realizaré a continuación el método problema-solución, el cual se basa en el principio de que toda invención es la solución a un problema técnico persistente, y lo haré de acuerdo con la metodología descrita por la Guía de la SIC⁹ tanto para la nueva Reivindicación 1.

La Reivindicación 1 reclama específicamente un anticuerpo que se une a Notch1, que comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 como se define en la SEQ ID NO: 73 o 74; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 como se define en la SEQ ID NO: 77 o 78; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 como se define en la SEQ ID NO: 81; (d) una región variable de cadena ligera CDR1 como se define en la SEQ ID NO: 99; (e) una región variable de cadena ligera CDR2 como se define en la SEQ ID NO: 101; y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 como se define en la SEQ ID NO: 103, esto es, se reclama el anticuerpo denominado variante VH1.1/VL1.8 del anticuerpo 438 humanizado. Adicionalmente, la Reivindicación 5 reclama un anticuerpo que se une a Notch1, que comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 como se define en la SEQ ID NO: 117 o 118; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 como se define en la SEQ ID NO: 121 o 122; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 como se define en la SEQ ID NO: 125; (d) una región variable de cadena ligera CDR1 como se define en la SEQ ID NO: 131; (e) una región variable de cadena ligera CDR2 como se define en la SEQ ID NO: 133; y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 como se define en la SEQ ID NO: 134, denominado variante VH1.0/VL1.1 del anticuerpo 351 humanizado,

Teniendo en cuenta el alcance limitado de la nueva Reivindicación 1, realizaré a continuación el análisis de nivel inventivo de la anterior de acuerdo con los pasos establecidos en la Guía de la SIC:

A. Identificar el estado de la técnica cercano a la invención reivindicada.

En primer lugar, vale la pena la atención sobre la Guía de la SIC, la cual determina que *“El estado de la técnica cercano es un documento que se encuentra en el mismo campo técnico que la invención o trata de solucionar el mismo problema o uno semejante. Suele ser el que tiene más características en común con la invención o presenta leves modificaciones de estructura e indica la misma función, propósito (y) En caso de que haya varios documentos relacionados, el*

⁸ Ibid., sección 2.13.5.1, página 131

⁹ Ibid., sección 2.13.5, páginas 131-134.

estado de la técnica cercano es el documento que menciona una función, propósito, problema a resolver ó actividad semejante al de la invención¹⁰ (énfasis fuera del texto). Contrario a lo estipulado por la Guía de la SIC, el Examinador determinó que D1 y D2 son el estado de la técnica más cercano a la presente invención. Sin embargo, en el presente caso D1 y D2 corresponden al estado de la técnica más cercano a la presente invención en tanto D1 divulga, en general, anticuerpos anti-Notch NRR. En particular, tanto D1 como D2 divulgan el anticuerpo A2, tal y como se menciona en la presente solicitud página 79, líneas 17 a 19.

B. Determinar la diferencia entre la invención y el estado de la técnica más cercano.

Teniendo en cuenta lo anterior, además del hecho que la presente invención reclama los anticuerpos humanizados 438 y 351, que son estructuralmente diferentes al anticuerpo A2, es importante resaltar que los tres anticuerpos se unen de manera diferente a la región reguladora negativa (NRR, por sus siglas en inglés) de la proteína Notch 1 (llamado así el gen que codifica para dicho receptor transmembrana). La Figura 2 de la presente solicitud ilustra que el perfil de unión al epítipo de los anticuerpos rat 438-mIgG1 y rat 351-mIgG1 (precursores de los anticuerpos 438 y 351 de la presente invención) a los dominios de NRR Notch 1 son distintos al perfil de unión a epítipo del anticuerpo A2 del arte previo a los dominios de NRR Notch 1. Más específicamente, la unión del anticuerpo A2 del arte previo al NRR es más dependiente del dominio LNR-B que la unión de los anticuerpos rat 438-mIgG1 y rat 351-mIgG1, como se muestra en la Tabla 14 de la presente solicitud.

Adicionalmente, al comparar los epítopos reconocidos por el anticuerpo A2 del arte previo en la Figura 1 de D2 con los residuos reclamados en las nuevas Reivindicaciones 4 y 8 permite concluir claramente que hay menos que los 7 u 8 amino ácidos comunes requeridos representados entre los dos epítopos, esto es, no hay siquiera 7 u 8 amino ácidos comunes entre el epítipo al que se une el anticuerpo A2 y los anticuerpos de la presente solicitud.

Junto con las diferencias estructurales mencionadas, los anticuerpos 438 y 351 son funcionalmente diferentes al anticuerpo A2 del arte previo. En particular, el anticuerpo 438 reclamado en la nueva Reivindicación 1 causa menor diferenciación celular en células intestinales (p. 113, líneas 20 y 21). De otra parte, el anticuerpo 351 se diferencia funcionalmente del anticuerpo A3 del arte previo en que el anticuerpo 351 demuestra una actividad neutralizante contra Notch 1 dependiente de señalización diferente, la cual puede ser

¹⁰ Ibid., página 132

resultado de unas proporciones K_a y K_d diferentes, como se muestra en la Tabla 12 de la presente solicitud.

C. Definir el efecto técnico causado y atribuible al elemento diferencial.

Dadas las diferencias entre el anticuerpo de las Reivindicaciones 1 y 5 y el anticuerpo del arte previo (A2) expuestas anteriormente en el presente memorial, me permito señalar los siguientes efectos técnicos alcanzados por la presente invención:

En cuanto a los parámetros farmacocinéticos, la Tabla 7 demuestra que el anticuerpo humaniza 351 variante VH1.0/VL1.1 (como la reclamada en la Reivindicación 5) retuvo completamente la reactividad cruzada del anticuerpo 351 de rata con respecto al Notch1 de ratón. La Tabla 8 demuestra que la variante VH1.1/VL1.8 del anticuerpo 438 humanizado (como la reclamada en la Reivindicación 1) presentó un valor de EC_{50} similar al anticuerpo 438 de rata, por lo que ambos anticuerpos combinen por la unión al inmunógeno NRR de Notch 1, es decir, el anticuerpo reclamado se une al mismo epítipo o uno muy similar al que se une el anticuerpo 438 de rata. Resultados similares se pueden concluir para la variante VH1.0/VL1.1 del anticuerpo 351 a partir de la Tabla 9.

Respecto a los resultados de las constantes de disociación (K_D) de la Tabla 12 se puede concluir que las variantes VH1.1/VL1.8 del anticuerpo 438 humanizado y VH1.0/VL1.1 del anticuerpo 351 presentaron mejoras respecto al k_a y K_D de los anticuerpos 438 y 351 provenientes de rata (ver última columna de la tabla 12 donde se muestran la diferencia en veces respecto al resultado del anticuerpo proveniente de la rata)

Por otra parte, a partir de los valores de IC_{50} que se presentan en la Tabla 16 se puede concluir que el anticuerpo A2 del arte previo presentó un IC_{50} de 0.31nM para Notch 1 humana, mientras que la variante VH1.1/VL1.8 del anticuerpo 438 humanizado presentó un IC_{50} de 0.17nM para Notch 1 humana. De hecho, dicha variante (reclamada en la Reivindicación 1) presentó la menor IC_{50} de todas las variantes, el anticuerpo 438 de rata y el anticuerpo A2 del arte previo.

De forma similar, las Figuras 10, 11 y la Tabla 17 demuestran que incluso, el anticuerpo 351 de rata presenta una inhibición máxima del receptor a menor dosis que el anticuerpo del arte previo (A2). De hecho, la Tabla 18 muestra que la variante VH1.0/VL1.1 del anticuerpo 351 humanizado aquí reclamado (en la Reivindicación 5) exhibe un perfil de actividad neutralizante similar al alcanzado por el anticuerpo 351 de rata, y ciertamente mejor que el anticuerpo A2 del

arte previo, e incluso menores IC_{50} en comparación con ambos anticuerpos (el de rata y el del arte previo). Adicionalmente, el Ejemplo 5 (donde están las tablas mencionadas anteriormente) de la presente invención demuestra que la inhibición máxima de humana y murina de señalización de Notch1 fue menor para el anticuerpo 351 que para el anticuerpo A2 (ver tabla 17 y Figura 10).

En este orden de ideas, es importante recordarle al Examinador que los valores de inhibición EC_{50} , K_D e IC_{50} son de gran relevancia en el campo biomédico, en donde claramente un menor orden de magnitud de dicho valor corresponde a una mayor actividad biológica del anticuerpo.

En este sentido, el Ejemplo 8 de la presente invención demuestra que el anticuerpo 351 demuestra una actividad inhibitoria potente frente al receptor Notch1 con una NRR mutante (es decir, células de leucemia HPC-ALL). Por consiguiente, la demostración que el anticuerpo 351 presenta una mayor inhibición de la activación de Notch1 mutante en comparación con la Notch1 nativa es una característica funcionalmente diferenciable entre el anticuerpo 351 reclamado y A2 (anticuerpo del arte previo).

Finalmente, con respecto a la estabilidad térmica (Tabla 13), como se muestra en la página 80, líneas 22 a 25 de la presente invención *“todas las variantes 438 humanizadas (incluyendo la variante VH1.1/VL1.8 aquí reclamada) tenían mayor termoestabilidad, como se demostró por el mayor punto de fusión, en su región Fab (todos mayores de 77°C) en comparación con 438-mIgG1 de rata”*.

En continuando con los resultados sorprendentes e inesperados de la presente invención, ahora llamo la atención del Examinador sobre las eficacias de los anticuerpos de la presente invención tal y como se muestra en la Tabla 32, 33, 34 y los resultados del Ejemplo 11 para la variante VH1.1/VL1.8 del anticuerpo 438 aquí reclamada.

Adicionalmente, las Tablas 27 a 29 presentan la comparación de eficacia entre los anticuerpos 438 y 351 provenientes de rata y el anticuerpo A2 del arte previo. Tal y como se puede evidenciar, la Tabla 27 muestra que el tratamiento con 351-mIgG1 de rata da como resultado 29% de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con los tumores tratados con un control en el día 28. Por su parte, la tabla 29 muestra cómo el tratamiento con rat 438-mIgG1 de rata y con rat 351-mIgG1 de rata inhiben el crecimiento in vivo de las células HPB-ALL en comparación con el anticuerpo A2, y que por lo tanto retarda el crecimiento tumoral.

Para finalizar el efecto diferencial, llamo respetuosamente la atención del Examinador sobre la Tabla 35 y el párrafo siguiente en donde se afirma que *“Además, la dosis de A2 a 10 mg/kg induce un aumento considerable en la relación de teñido con azul de Alcian en comparación con la dosis de 438-mIgG1 de rata a 10 mg/kg, lo cual sugiere que 438-mIgG1 de rata causa menos diferenciación celular en las células intestinales que A2.”* (subrayado fuera de texto).

D. Deducir el problema técnico a solucionar.

Con base en todo lo anteriormente mencionado respecto al arte previo, el problema técnico de la presente invención, tal como se propone en la página 2, líneas 16 a 18 del Capítulo Descriptivo de esta solicitud, radica en la necesidad:

“(…) aún se necesitan en el arte de nuevas terapias anti-Notch1 para el tratamiento del cáncer, mientras que se proporcionan efectos secundarios reducidos, en particular, toxicidad intestinal.”

Es decir, los anticuerpos de la presente invención pretenden proporcionar una terapia anti-Notch 1 para el tratamiento del cáncer alternativa a la del arte previo, en particular al anticuerpo A2 divulgado en D1 y D2.

E. Evaluar si la invención reivindicada, partiendo del estado de la técnica cercano y del problema técnico objetivo, habría sido obvia para la persona medianamente versada en la materia.

Respecto a la presente etapa del análisis, la Guía de la SIC establece que: *“Esta etapa consiste en responder a la pregunta de si en el estado de la técnica en su conjunto hay un segundo documento que contiene una enseñanza que indicaría (no sólo que podría indicar, sino que indicaría) a la persona medianamente versada en la materia, enfrentada al problema técnico, cómo modificar o adaptar el estado de la técnica más cercano para resolver el problema, de la forma reivindicada, sin realizar una actividad inventiva”* (subrayado y énfasis fuera de texto).

Evidentemente, el arte previo citado por el Examinador no brinda las enseñanzas suficientes para que la persona medianamente versada en la materia desarrolle la presente invención sin ambigüedad alguna. Como lo demostré anteriormente, el anticuerpo de D1 y D2 es estructuralmente diferente a los de la presente invención tal y como se encuentra definida en la Reivindicación 1 y 6.

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Adicionalmente, los datos proporcionados a lo largo de los Ejemplos (páginas 40 a 120) y en particular las resaltadas en el presente memorial demuestran que los anticuerpos reclamados en la presente invención son mejores que el anticuerpo A2 del arte previo, el cual incluso se utilizó en muchos ensayos como anticuerpo control.

En este sentido, vale la pena señalar que el Manual Andino de Patentes (MAP) también establece que las invenciones en el campo de la química (biotecnología) tienen nivel inventivo cuando el compuesto (en este caso los anticuerpos) reclamado tiene una estructura inesperada (no derivable por la persona medianamente versada en la materia) o cuando presentan un uso o efecto sorprendente.¹¹ Por tales razones, es claro que en el presente caso, no sólo las características de los anticuerpos reclamadas son inesperadas, sino también que los efectos técnicos logrados por los mismos, lo que es una clara evidencia de nivel inventivo.

En conclusión, a la luz de la clara evidencia en favor del nivel inventivo de la presente invención suministrada anteriormente, la persona medianamente versada en la materia no habría encontrado sugerencia o motivación alguna que la condujera directamente a desarrollar los anticuerpos aquí reclamados, ni mucho menos los efectos sorprendentes y evidentemente superiores sobre los del arte previo citado.

5. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por el Examinador en su primer examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado;
- Hojas Sustitutas 4, 52, 74, 75, 78, 84, 98, 108 y 113.

¹¹ Manual Andino de Patentes, ISBN-9978-43-855-6. Sección 10.8.1. Páginas 82.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Primer Examen de Fondo)

1. Un anticuerpo que se une a Notch1, que comprende:
 - a) una región variable de cadena pesada CDR1 como se define en la SEQ ID NO: 73 o 74;
 - b) una región variable de cadena pesada CDR2 como se define en la SEQ ID NO: 77 o 78;
 - c) una región variable de cadena pesada CDR3 como se define en la SEQ ID NO: 81;
 - d) una región variable de cadena ligera CDR1 como se define en la SEQ ID NO: 99;
 - e) una región variable de cadena ligera CDR2 como se define en la SEQ ID NO: 101; y
 - f) una región variable de cadena ligera CDR3 como se define en la SEQ ID NO: 103.

2. El anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende:
 - una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 69 y 71; y
 - una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 105, 107 y 109.

3. El anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende:
 - una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es tal y como se indica en la SEQ ID NO: 111; y
 - una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es tal y como se indica en la SEQ ID NO: 113.

4. Un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos Asn 1461, Lys 1462, Val 1463, Asp 1671, Arg 1673, Leu 1713, y Lys 1718.

5. Un anticuerpo que se une a Notch1, que comprende:
 - (a) una región variable de cadena pesada CDR1 como se define en la SEQ ID NO: 117 o 118;
 - (b) una región variable de cadena pesada CDR2 como se define en la SEQ ID

NO: 121 o 122;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 como se define en la SEQ ID NO: 125;

(d) una región variable de cadena ligera CDR1 como se define en la SEQ ID NO: 131;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 como se define en la SEQ ID NO: 133; y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 como se define en la in SEQ ID NO: 135.

6. El anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 5, que comprende:

una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es tal y como se indica en la SEQ ID NO: 115; y

una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es tal y como se indica en las SEQ ID NO: 127, 129, 137, 139, 141, 143, 145 y 147.

7. El anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 5, que comprende:

una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es tal y como se indica en la SEQ ID NO: 149; y

una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es tal y como se indica en la SEQ ID NO: 151.

8. Un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde el anticuerpo se une a un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos Asp 1458, Val 1463, Tyr 1621, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Ser 1712 y Leu 1713.

9. El anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde dicho anticuerpo muestra una mayor inhibición de la activación de Notch1 de un receptor de Notch1 mutante en comparación con la inhibición de la activación de Notch1 de un receptor de Notch1 nativo.

10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo es de la subclase IgG1.

11. Un ácido nucleico que codifica al anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-10.

12. Un ácido nucleico que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que

consiste en SEQ ID NOS: 72, 98, 112, 114, 116, 130, 150 y 152.

13. Un vector que comprende al ácido nucleico de la Reivindicación 11 o 12.
14. Una célula hospedera que comprende al vector de la Reivindicación 13.
15. Una célula hospedera que produce recombinantemente al anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-10.
16. Una composición farmacéutica que comprende al anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Tyr 1621, Gly 1622, Met 1670, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Leu 1707, Ala 1708, Leu 1710, Gly 1711, Ser 1712, Leu 1713, Pro 1716 y Lys 1718.

En otra forma de realización, la presente invención proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una región variable de la cadena pesada, que tiene una región CDR1, una región CDR2 y una región CDR3 de la región variable de la cadena pesada, que comprende la SEQ ID NO: 115.

En otra forma de realización, la presente invención provee anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una región variable de la cadena liviana, que tiene una región CDR1, una región CDR2 y una región CDR3 de la región variable de la cadena liviana, que comprende la SEQ ID NO: 129.

La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen 1) una región variable de la cadena pesada, que tiene una región CDR1, una región CDR2 y una región CDR3 de la región variable de la cadena pesada, que comprende la SEQ ID NO: 115, y 2) una región variable de la cadena liviana, que tiene una región CDR1, una región CDR2 y una región CDR3 de la región variable de la cadena liviana, que comprende la SEQ ID NO: 129.

También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una región variable de la cadena pesada que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 115. También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada indicada en la SEQ ID NO: 115.

También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 129. También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que se indica en la SEQ ID NO: 129.

También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 149. También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que se indica en la SEQ ID NO: 149. También se proporcionan anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 151. También se proporcionan anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos de la

Se homogenizan de uno a cinco millones de las células de hibridoma subclonadas para obtener la aislación total del ARN, mediante el kit de QIAGEN RNeasy Mini kit. Luego, se produce la primera cadena de ADNc mediante el kit SuperScript III RT (Invitrogen). Posteriormente, se produce ADNc bicatenario para las regiones variables de anti-Notch1 IgG y se amplifica mediante PCR utilizando cebadores de las regiones constantes de la cadena pesada (IgG1, 2a, 2b) y de la cadena liviana (kappa o lamda) IgG de rata, como se describe más adelante. Condiciones de ciclado de PCR: 1 ciclo a 95 °C durante 1 min; 25 ciclos a 95 °C durante 1 min, 63 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min. Los productos de RT-PCR resultantes son clonados en el vector de clonación TOPO-Blunt (Invitrogen), y secuenciados mediante métodos convencionales.

Los ADNc de la región variable (V) de 438 de rata parental y 351 de rata parental (en adelante, “438 de rata” y “351 de rata”, respectivamente) son subclonados en vectores de expresión de mamíferos en los que la cadena pesada variable (VH) de rata se fusiona en marco con IgG1 murino (mIgG1), y la cadena liviana variable (VL) de rata se fusiona con kappa murino. De manera similar, para la generación de anticuerpos quiméricos con la región V de rata y la región constante IgG humano, se fusiona VH de rata en marco con IgG1 humano (hIgG1), y VL con kappa humano, respectivamente. Los anticuerpos quiméricos correspondientes se generan a partir de estos constructos mediante transfección transitoria en células COS, y su ligación y actividades neutralizantes se confirman mediante ensayos.

Los anticuerpos quiméricos constantes de ratón o rata purificados (en adelante, “438-mIgG1 de rata” y “351-mIgG1” de rata) se caracterizan adicionalmente en una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo*, que incluyen ligación de antígeno recombinante y de objetivo de superficie celular, inhibición de la actividad de Notch1 en los ensayos de RGA y de angiogénesis, e inhibición de crecimiento tumoral en modelos ratón, como se describe en los Ejemplos que se encuentran más adelante. Los anticuerpos iniciales 438 de rata y 351 de rata se seleccionan en función de estos estudios. En la **Tabla 2**, se enumeran las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de diversas regiones de las regiones variables de 438 de rata y 351 de rata, y de clones adicionales 90, 132, 132 (A12/G11) y 137.

Tabla 2: Secuencias de región variable de rata

el almac3n aceptor humano a los residuos 438 y 351 de rata en las posiciones correspondientes para optimizar la actividad y el ep3toto de ligaci3n.

Tabla 5: Retromutaciones en VH y VL de variantes 438 humanizadas y 351 humanizadas

Variante VH 438	1.0	1.1							
Retromutaci3n VH	ninguna	R94K							
Variante VL 438	1.0	1.1	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
Retromutaci3n VL	ninguna	M4L L46V Y49K	M4L	L46V	Y49K	M4L L46V	M4L Y49K	L46V Y49K	Q3M M4L L46V Y49K
Variante VH 351	1.0								
Retromutaci3n VH	ninguna								
Variante VL 351	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	
Retromutaci3n VL	ninguna	L46V Y49K	M4L	L46I	Y49K	M4L L46I	M4L Y49K	M4L L46V Y49K	

Ejemplo 3

Caracterizaci3n de anticuerpos inhibidores de Anti-Notch

A. Expresi3n y ligaci3n a Notch1

Se ensayan los rendimientos de expresi3n relativos de las variantes 438 y 351 humanizadas en un ensayo de expresi3n transitorio en c3lulas COS. Como se muestra en la Tabla 6, muchas de las variantes 438 humanizadas, que incluyen 438 VH1.1/VL1.8 humanizado, y muchas de las variantes 351 humanizadas, que incluyen 351 VH1.0/VL1.1 humanizado, muestran rendimientos.

Tabla 6. Rendimiento de expresi3n relativa en medios condicionados de variantes 438 y 351 humanizadas en la expresi3n transitoria en c3lulas COS.

438 Variante	VH1.0 /VL1.3	VH1.0/ VL1.4	VH1.0/ VL1.5	VH1.0/ VL1.6	VH1.0/ VL1.7	VH1.0/ VL1.8	VH1.0/ VL1.9	VH1.0/ VL1.10
438 Rendimiento (µg/ml)	41.51	41.63	85.73	35.11	36.94	40.08	51.9	62.58
438 Variante	VH1.0/ VL 1.11	VH1.1/ VL1.3	VH1.1/ VL1.4	VH1.1/ VL1.5	VH1.1/ VL1.6	VH1.1/ VL1.7	VH1.1/ VL1.8	VH1.1/ VL1.9
438 Rendimiento (µg/ml)	45.86	23.2	49.47	65.93	47.72	31.95	66.65	14.12
438 Variante	VH1.1/ VL1.10	VH1.1/ VL1.11						
438 Rendimiento (µg/ml)	36.7	37.54						
351 Variante	VH1.0/ VL1.0	VH1.0/ VL1.1	VH1.0/ VL1.2	VH1.0/ VL1.3	VH1.0/ VL1.4	VH1.0/ VL1.5	VH1.0/ VL1.6	VH1.0/ VL1.7
351 Rendimiento (µg/ml)	33.5	26.66	24.52	25.1	35.20	29.25	28.93	33.54

Los niveles de expresión totales de los IgG en medio acondicionado se miden mediante IgG ELISA cuantitativo, como se describe en Ejemplo 2. En la Tabla 7 se muestran valores de EC₅₀ (nM) calculados de ELISA de ligación a Notch1 de superficie celular para las variantes 438 humanizadas y 438 de rata, junto con las variantes 351 humanizadas y 351 de rata.

Los datos demuestran que múltiples variantes de 438 humanizado, que incluyen 438 VH1.1/VL1.8 humanizado, son similares a 438 de rata en ligación a Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular de las células U-2 OS. Además, en la **Tabla 7** se muestra que tanto 438 VH1.1/VL1.8 humanizado como VH1.1/VL1.3 retienen completamente la reactividad cruzada de 438 de rata con respecto al Notch1 de ratón expresado en la superficie celular de las células U-2 OS.

Los datos también muestran que 351 VH1.0/VL1.1 y VH1.1/VL1.4 humanizados son similares a 351 de rata en ligación a Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie de la célula de las células U-2 OS. Además, la Tabla 7 muestra que los 351 VH1.0/VL1.1 y VH1.1/VL1.4 humanizados retienen por completo la reactividad cruzada de 351 de rata con respecto al Notch1 de ratón expresado en la superficie celular de las células U-2 OS.

Tabla 7. Valores de EC₅₀ (nM) de ELISA de ligación a Notch 1 en la superficie celular para las variantes 438 humanizadas y 438 de rata, y para las variantes 351 humanizadas y 351 de rata.

EC50 (nM)								
Anticuerpo	438 de rata	VH1.0/VL1.1	VH1.1/VL1.0	VH1.1/VL1.1	VH1.1/VL1.3	VH1.1/VL1.5	VH1.1/VL1.8	VH1.1/VL1.9
Notch1 humano	0.2132	0.305	0.2956	0.1773	0.1516	0.2189	0.2025	0.1776
Notch1 de ratón	0.1725	0.2287	0.1437	0.1291	0.09337	0.1457	0.1489	0.1374
EC50 (nM)								
Anticuerpo	351 de rata	VH1.0/VL1.1	VH1.0/VL1.4					
Notch1 humano	0.10	0.15	0.10					
Notch1 de ratón	0.07	0.08	0.07					

B. ELISA de competición

Se llevan a cabo ELISA de competición entre variantes 438 humanizadas y 438 de rata biotiniladas, y variantes de 351 humanizadas y 351 de rata biotiniladas en Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular. De manera similar a la descrita para ELISA basadas en células o proteína recombinante, se

cercanos de la región Notch1 NRR son Notch2 y Notch3 (homología de ~50%), y Notch4 es un homólogo más distante (homología del 34%). La reactividad cruzada de anticuerpos anti-Notch1 con respecto a otros miembros de la familia Notch, en especial Notch2, puede generar efectos no deseados en los pacientes. Por ello, se evalúa la reactividad cruzada de anticuerpos 438 de rata y 438 humanizado, junto con 351 de rata y 351 humanizado con respecto a otros miembros de la familia Notch.

Los constructos de expresión que codifican regiones Notch2 y Notch3 NRR humano con fragmento IgG1 Fc humano se introducen de manera estable en células CHO-PACE. Se recolecta medio acondicionado de estas células que expresan fusiones NRR-Fc. El Notch2 NRR-Fc humano y el Notch3 NRR-Fc ratón se purifican mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguido de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los preparados purificados se someten a diálisis en TBS con 1 mM de CaCl₂ y se analizan en SEC analítica para que su pureza sea >99%.

Como se muestra en la Tabla 10, el 438 de rata carece de ligación detectable a la proteína de fusión Notch 2 NRR-Fc humano. Como también se muestra en la Tabla 10, las variantes 438 humanizadas carecen de ligación detectable al Notch3 humano de longitud completa expresado en la superficie celular de U-2 OS, lo cual demuestra que 438 no tiene reactividad cruzada con Notch3.

Tabla 10. Ligación de variantes de mIgG1 de rata y 438 humanizado con Notch2 NRR-Fc y Notch3 en células U-2 OS (N/B representa sin ligación).

Ligación a Notch2 NRR-Fc		Ligación a Notch3 en células U2-OS	
438-mIgG1 de rata	N/B	438-mIgG de rata	N/B
438 VH1.0/VL1.1 humanizado	N/B	A2	N/B
438VH1.1/VL1.0 humanizado	N/B		
438VH1.1/VL1.3 humanizado	N/B		
438VH1.1/VL1.5 humanizado	N/B		
438VH1.1/VL1.8 humanizado	N/B		
438VHH1.1/VL1.9 humanizado	N/B		
A2	N/B		

Como se muestra en la Tabla 11, el 351 VH1.0/VL1.1 humanizado carece de ligación detectable a la proteína de fusión Notch 2 NRR-Fc humano, y a las proteínas de fusión Notch3 NRR-Fc de humano y ratón. Sin embargo, 351 VH1.0/VL1.1 humanizado tiene reactividad cruzada con Notch1 NRR de humano, ratón y cyno.

Tabla 11. Ligación de 351 VH1.0/VL1.1 humanizado a Notch1 recombinante de humano, ratón y cyno; Notch2 de humano; y proteínas de fusión Notch3 NRR-Fc de humano y ratón (N/B representa sin ligación).

superficie más grande. Solo 438 de rata interactúa con la región de bucle S1, y solo A2 interactúa con LNR-B. Más específicamente, los datos muestran que 438 de rata se liga a los siguientes residuos de Notch1 NRR humano: Asn 1461, Lys 1462, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Tyr 1621, Gly 1622, Met 1670, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Leu 1707, Ala 1708, Leu 1710, Gly 1711, Ser 1712, Leu 1713, Pro 1716 y Lys 1718.

Los datos también muestran que 351 de rata y A2 ligan superficies superpuestas pero distintas dentro de Notch1 NRR. En particular, solo 351 de rata interactúa con la región de bucle S1, y solo A2 interactúa con LNR-B. Tanto 351 de rata como A2 interactúan con LNR-A, sin embargo, 351 de rata interactúa con un subconjunto distinto de aminoácidos LNR-A. Más específicamente, los datos muestran que 351 de rata se liga a los siguientes residuos de Notch1 NRR humano: Asp 1458, Asn 1461, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Met 1581, Pro 1582, Tyr 1621, Gly 1622, Arg 1623, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Gly 1674, Leu 1710, Gly 1711, Ser 1712, Leu 1713, Asn 1714, Ile 1715, Pro 1716, Lys 1718.

La estructura cristalina de rayos X de la ligación de los residuos de 438 de rata y 351 de rata a Notch1 NRR es objeto de otros análisis mediante el programa PISA. Los datos muestran que 438 de rata forma fuertes interacciones electrostáticas (puentes de sal) con los residuos Lys1718 y Arg1673. Los residuos de Notch1 NRR que forman puentes de hidrógeno con el anticuerpo 438 de rata son Asn1461, Asp1671, Arg1673, Leu1713, Lys1718, Cys1464, Ala1708 y Ser1712. Los residuos de Notch1 NRR que contribuyen más de 40 Angstrom² de área superficial enterrada durante la formación del complejo con 438 de rata son Arg1673, Val1463, Lys1462, Gly1622, Asp1671 de la interacción con la cadena pesada, y Leu1466, Lys1718, Gly1711, Cys1464, Pro1716 y Val1463 de interacciones con la cadena liviana. Entre los residuos identificados, 438 de rata se liga a Notch1 NRR humano por lo menos en los residuos Asn1461, Val1463, Lys1462, Asp1671, Arg1673, Leu1713 y Lys1718.

Los datos muestran que 351 de rata forma fuertes interacciones electrostáticas (puentes de sal) con los residuos Asp1458 y Arg1673. Los residuos de Notch1 NRR que forman puentes de hidrógeno con el anticuerpo 351 de rata son Asp1458, Val1463, Cys1464, Ser1465, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Gly1711, Ser1712, Leu1713 y Asn1714. Los residuos Notch1 NRR que contribuyen más de 40 Angstrom² de área superficial enterrada durante la formación del complejo con 351 de rata son Val1463, Cys1464, Leu1466, Gly1711, Asn1714, Pro1716 y Lys1718 de la interacción con la cadena liviana, y Asn1461, Leu1580, Asp1671 y Arg1673 de

Las líneas celulares de T-ALL con mutaciones de clase 1 del receptor de Notch1 ensayadas incluyen células HPB-ALL con una mutación de leucina a prolina en el aminoácido 1575 (L1575P), células ALL-SIL con una mutación de leucina a prolina en el aminoácido 1594 (L1594P), células MOLT-4 con una mutación de leucina a prolina en el aminoácido 1601 (L1601P) y células DND-41 con mutaciones de clase 1 de compuesto de leucina a prolina en la posición de aminoácido 1594 y de ácido aspártico a valina en la posición de aminoácido 1610 (L1594P/ D1610V). La línea celular CCRF-CEM aloja una mutación de clase 2 y tiene una inserción de 12 aminoácidos en la posición 1595. La línea celular Jurkat aloja una mutación JEM de clase 3 que inserta 17 aminoácidos en la posición 1740.

La activación de Notch1 y la liberación de Notch1^{ICD} se examinan mediante análisis de transferencia Western de extractos proteicos generados de las líneas celulares de T-ALL tratadas con concentraciones crecientes de anticuerpos 438-mIgG1 de rata, 438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 351-mIgG1 de rata o A2, y de anticuerpo anti-E. tenella de control. Las moléculas de Notch1^{ICD} liberadas que empiezan en un residuo de valina se detectan específicamente con anticuerpo D3B8 (anti-Notch1^{ICD}).

Se utilizan las líneas celulares de T-ALL: HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4, DNP-ALL y Jurkat en lugar de fibroblastos CCD1076SK como se describió anteriormente.

Debido a que las células de T-ALL poseen Notch1^{IC} constitutivamente liberado, no se requiere ligando DLL4 exógeno. Los cultivos de suspensión de células 2x10⁶ T-ALL se mezclan con 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 µg/ml de anticuerpos 438-mIgG1 de rata, 438 VH1.1/VH1.8 humanizado, 351-mIgG1 de rata o A2, y anticuerpo anti-E. tenella de control en medio RPMI 1640 que contiene FBS al 10%, Pen/Strep/Glutamina. Se incuban las células con los anticuerpos durante 24 horas a 37 °C en 5% de CO₂. Se cosechan las células por centrifugación y se retira el medio por aspiración. Se lisan los pelets celulares en 1% de NP40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 5 mM de EDTA, NaCl 0,25 M, Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5, que contiene cóctel inhibidor Complete Mini Protease (Roche). Se resuelven los extractos mediante SDS-PAGE en 7,5% de gel de poliacrilamida y se transfiere a papel de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia iBlot Gel (Invitrogen). Las moléculas de Notch1^{ICD} liberadas empiezan en un residuo de valina se detectan con anti-Notch1^{ICD} y, como control de carga, anti-beta-actina mediante procedimientos de transferencia Western estándares. Se lleva a cabo el análisis densitométrico en películas que se escanean con un BioRad GS-800 Calibrated Densitometer y se analizan con software

S,E,M,	4,9	5,0	7,3	25,6	21,6	25,9
	A2					
	Día 0	Día 1	Día 4	Día 8	Día 11	Día 14
Volumen del tumor (mm³)	174,5	197,9	218,5	201,4	157,5	146,3
S,E,M,	2,8	4,6	7,4	12,5	13,2	13,9

D. Estudios de inhibición del crecimiento *in vivo* de xenoinjertos de Calu-6 NSCLC

Se llevan a cabo experimentos similares *in vivo* con la línea celular Calu-6 NSCLC como se realizó con células HPB-ALL antes descritas para los estudios *in vivo*. Los xenoinjertos Calu-6 se establecen inicialmente en ratonas lampiñas (Nu/Nu) de 2x10E6 células cultivadas *in vitro* en Matrigel 50% (BD Biosciences) y luego se los hace pasar en serie *in vivo* como fragmentos tumorales de animal en animal. Cuando los tumores alcanzan un volumen de 200 a 400 mm³, se los escalona a efectos de asegurar la uniformidad del tamaño del tumor entre varios grupos de tratamiento antes de la administración de anticuerpos anti-Notch1 y de control. Se suministra una dosis i.p. de modelo Calu-6 con 3, 10 y 30 mg/kg de 438-mlgG1 de rata o A2, o 10 mg/kg de anti-E. tenella de control, 2 veces por semana durante 2 semanas. Los tumores se miden por lo menos una vez por semana, y se calcula su volumen mediante la siguiente fórmula: volumen del tumor (mm³) = 0,5 x (ancho² del tumor) (longitud del tumor). De 8-11 animales, se calculan los volúmenes medios de los tumores (± SEM) para cada grupo de tratamiento, y se comparan con el grupo de control tratado.

Se eligió el modelo Calu-6 porque se había demostrado previamente que responde a inhibidores de la vía de Notch, tales como anticuerpos anti-DLL4 (Ridgeway et al., Nature 444:1083-1087, 2006) y A2. La **Tabla 30** muestra la eficacia de 438-mlgG1 de rata y A2 en el modelo de cáncer pulmonar Calu-6. El tratamiento con 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg de 438-mlgG1 de rata da como resultado una disminución dependiente de la dosis en el crecimiento tumoral. Sin embargo, una reducción eficaz del crecimiento (>50%) de los xenoinjertos Calu-6 solo ocurrió con la dosis de 30 mg/kg, que fue 3 veces mayor que la dosis necesaria para inhibir el crecimiento de 37622A1 PDX en un nivel similar.

Tabla 30. Eficacia de 438-mlgG1 de rata y A2 en el modelo de cáncer pulmonar Calu-6.

	Día 0	Día 6	Día 9	Día 13	Día 16	Día 19
Anti-E. tenella (10 mg/kg)	258±17	491±34	740±64	1156±140	1260±171	1613±222
438-mlgG1 de rata (3 mg/kg)	250±29	362±58	465±88	742±127	888±171	1279±219
438-mlgG1 de rata (10 mg/kg)	263±26	383±40	448±51	566±68	667±87	904±129
438-mlgG1 de rata (30 mg/kg)	242±27	343±58	445±82	566±106	601±120	720±152
A2 (3 mg/kg)	238±29	349±42	450±58	603±74	664±91	851±113
A2 (10 mg/kg)	250±34	297±35	348±47	444±64	480±70	603±101
A2 (30 mg/kg)	241±26	376±52	486±68	598±115	622±121	779±168

con anti-E. tenella de control en el estudio de eficacia Calu-6. En comparación con anti-E. tenella de control con 10 mg/kg, se produce un aumento considerable de la relación de teñido con azul Alcian en 438-mlgG1 de rata suministrado en dosis de 10 mg/kg y 30 mg/kg. El análisis de imagen cuantitativa de teñido con azul Alcian confirma el aumento de diferenciación de células caliciformes en una región más grande del íleo, en comparación con la región que se indica en la **Figura 27**.

La **Tabla 35** muestra una cuantificación de imagen de la relación de teñido con azul Alcian de intestinos de ratón tratados con anticuerpos 438-mlgG1 de rata y A2, y con anti-E. tenella de control en el estudio de eficacia Calu-6.

Grupo de tratamiento	Relación de teñido con azul Alcian	S.E.M.
ANTI-E. TENELLA, 10mg/kg	2,71	0,23
438-mlgG1 de rata, 3mg/kg	3,97	0,59
438-mlgG1 de rata, 10mg/kg	7,64	0,79
438-mlgG1 de rata, 30mg/kg	8,24	0,63
A2, 3mg/kg	7,38	1,44
A2, 10mg/kg	14,13	2,32
A2, 30mg/kg	11,63	1,07

El análisis estadístico de las comparaciones en pares entre las relaciones promedio o media de teñido con azul Alcian de cada grupo de tratamiento se muestran en la **Tabla 36**. Las relaciones para cada par se determinan con la prueba *t* de Student. Los valores positivos muestran pares de medias que son considerablemente diferentes. A diferencia de A2, las dosis de 438-mlgG1 de rata a 3 mg/kg no inducen un aumento considerable en la relación de teñido con azul Alcian en comparación con el anticuerpo anti-E. tenella de control. Además, la dosis de A2 a 10 mg/kg induce un aumento considerable en la relación de teñido con azul Alcian en comparación con la dosis de 438-mlgG1 de rata a 10 mg/kg, lo cual sugiere que 438-mlgG1 de rata causa menos diferenciación celular en las células intestinales que A2.

Tabla 36. Análisis estadístico de comparaciones de la media del teñido con azul Alcian.

t	Alpha						
2.03452	0,5						
Abs(Dif)-LSD	A2 10mpk	A2 30mpk	438-mlgG1 de rata 30mpk	438-mlgG1 de rata 10mpk	A2 3mpk	438-mlgG1 de rata 3mpk	Anti E-tenella 10mpk
A2 10mpk	-3,48282	-0,9733	2,409854	2,84528	3,268058	6,512037	7,942685
A2 30mpk	-0,9733	-3,48282	-0,09967	0,335759	0,758538	4,002516	5,433165
438-mlgG1 de rata 30mpk	2,409854	-0,09967	-3,48282	-3,0474	-2,62462	0,619362	2,05001
438-mlgG1 de rata 10mpk	2,84528	0,335759	-3,0474	-3,81524	-3,40003	-0,14848	1,2746
A2 3mpk	3,268058	0,758538	-2,62462	-3,40003	-3,48282	-0,23884	1,191806