



No. 13-158445- -00000-0000

Fecha: 2013-07-04 17:16:0 Dep. 2020 DIR.NUEVASCRE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS ANTI-NOTCH1.

SOLICITANTE: WYETH LLC

DIRECCIÓN: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey, 07940.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 14 de junio de 2013

P2013/000105



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000105

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH LLC

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey, 07940

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 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2011/055595

Fecha Diciembre 09, 2011

Publicación Internacional No. WO 2012/080926 A3

Fecha Junio 21, 2012

6

Título (54) ANTICUERPOS ANTI-NOTCH1.

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Diciembre 15, 2010

Octubre 28, 2011

(31) Número de Solicitud

61/423.578

61/552.578

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha _____

10

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.

☐

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

☒

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 417(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.

☒

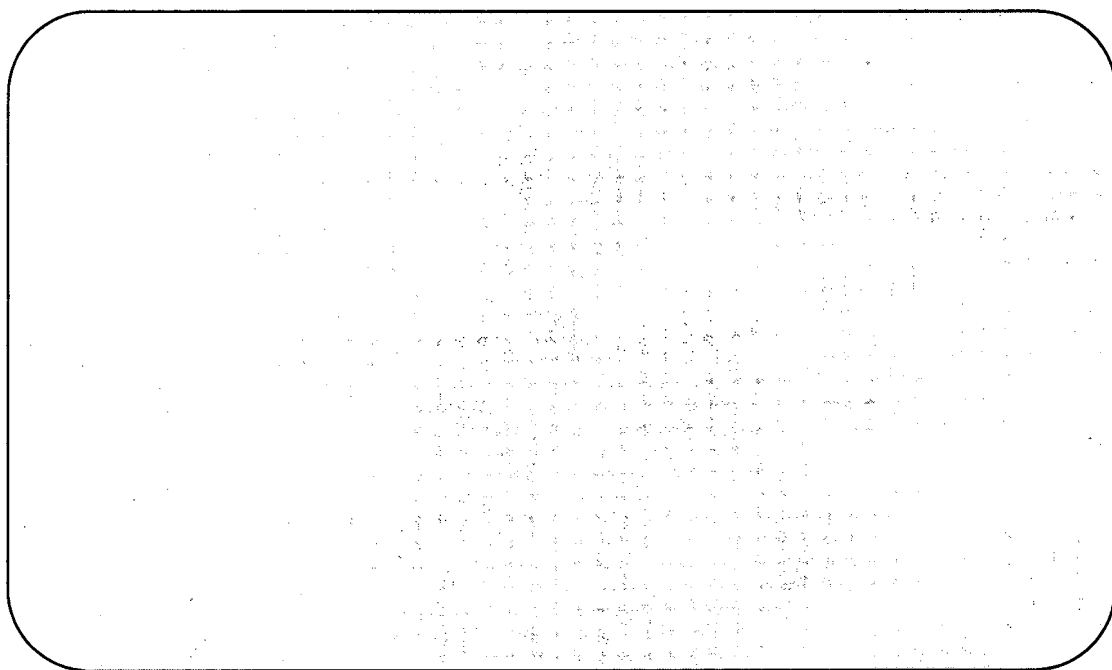
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295



LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2011/055595

GELES, Kenneth G.

Pfizer Inc., 401 N. Middletown Road,
Building 140 – 4th Floor, Pearl River,
New York, 10965,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

ZHOU, Bin-Bing Stephen

18 Prescott Road, Ho Ho Kus,
New Jersey, 07423,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

TCHISTIAKOVA, Lioudmila Gennadievna

Pfizer Global Research and Development,
87 Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts, 02140,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

GAO, Yijie

Pfizer Global Research and Development,
87 Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts, 02140,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

BARD, Joel

Pfizer Global Research and Development,
87 Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts, 02140,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

A

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0066504
		Bogotá D.C., Julio 05 de 2013 - 10:04:18

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	462578852	04/07/2013	10.882.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	
			Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
			500.000.00 500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>
			=====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-158445- -00000-0000
Fecha: 2013-07-04 17:16:0 Dep. 2020 DIR.NUEVASCRE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



No. 13-158445-00000-0000

Fecha: 2013-07-04 17:16:0

Dep. 2020 DIR.NUEVASCRE

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 4

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE U.

☐	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 ☐



ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO:

CINCO MIL CIENTO UNO (5101)-----

FECHA DE OTORGAMIENTO:

CUATRO (4) DE JUNIO DE DOS MIL DIEZ (2010)-----

Se copio
412 X 13
copio
en 7
may 25
2010
08-06-10
h

NOTARIA TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.-----

CODIGO NOTARIAL 1100100038.-----

SUPERINTENDENCIA DE NOTARIADO Y REGISTRO.-----

FORMULARIO DE CALIFICACION.-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE DOCUMENTOS.-----

PERSONAS QUE INTERVIENEN: **CARLOS REINALDO OLARTE**, identificado con cedula de ciudadanía numero 79,782,747 expedida en Bogotá D.C.-----

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, a los CUATRO (04) días del mes de JUNIO de dos mil diez (2010), ante mí **EDUARDO DURAN GOMEZ.** **NOTARIO TREINTA Y OCHO (38E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.**-----

Compareció con minuta escrita el señor **CARLOS REINALDO OLARTE**, mayor de edad, con domicilio y residencia en la ciudad de Bogotá, identificado con la cedula de ciudadanía número 79,782,747 de Bogotá D.C., de estado civil Casado, con sociedad conyugal vigente, quien manifestó su propósito de celebrar el acto que define las siguientes estipulaciones:-----

PRIMERA.- Que presenta para su Protocolización los siguientes documentos:-----

1º Traducción oficial de un documento que esta originalmente en inglés contenida en cuatro (4) folios utiles y es del siguiente tenor:-----

PODER GENERAL.- WYETH LLC.- domiciliado en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America.- nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, 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

COPIA DE LA ESCRITURA
Ante la 38 (E) del Circulo de Bogotá

administrativas, judiciales o de policia, 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 presentación 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 nuestro interes.- Firma: Gregg C. Benson.- Fecha: 4 MAY 2010.- Ciudad, País: GROTON, CONNECTICUT USA.-----

CERTIFICACION NOTARIAL.- En esta fecha, May 6 2010.- el Notario Público suscrito certifica: -----

1. Que GREGG C. BENSON mayor de edad y domiciliado en EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA suscribió el documento que antecede.-----
2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de ATTORNEY-IN-FACT de WYETH LLC.-----
3. Que WYETH LLC con sede principal ubicada en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America 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 está es legitima.-----
5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) autenticado(s): Power of Attorney executed on November 16, 2009.- NOTARY PUBLIC (Signature): (Firmado).-



Nancy M. George.- My Commission Expires 30 June 2011.-
(Sellado).-----

**TRADUCCION OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE
ESTA ORIGINALMENTE EN INGLES.-**

Sello: "El Distrito
de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mi, este día
7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario

Público, Distrito de Columbia.- Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011.".-

(Hay otra firma ilegible).- Apostilla adjunta: Distrito de Columbia.- APOSTILLA:
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961).-----

1. País: Estados Unidos de América.- El presente documento público.-----

2. Ha sido firmado por: Lisa Renee Johnson.- Notario Público en y para el Distrito
de Columbia.-----

3. Actuando en calidad de: Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el
Distrito de Columbia.-----

4. Lleva el sello/estampilla de: Certificado.-----

5. En: Washington D.C.-----

6. El: Día 7 de mayo de 2010.-----

7. Por: El Secretario del Distrito de Columbia.-----

8. Bajo el No.: 229806.-----

9. Sello / estampilla: Distrito de Columbia.- (Firmado).-----

10. Firma: Stephanie D.Scott.- Traductor Oficial.- JORGE E. SIERRA REYES.-

Licencia 376-1993 Minjusticia.- MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

160507 JORGE SIERRA CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO

DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS.- NO ASUME RESPONSABILIDAD

DEL TEXTO 2010 MAY 27 A 10:17 (FIRMADO) JEFE DE LEGALIZACIONES

BOGOTA D.C.-----

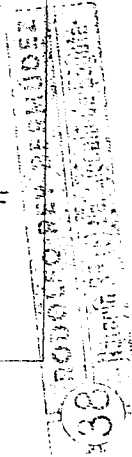
DISTRICT OF COLUMBIA.- APOSTILLE.- (Convention de La Haye du 5 octobre
1961).-----

1. District of Columbia United States of America.-----

2. This public document has been signed by LISA RENEE JOHNSON.-----

3. acting on the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF
COLUMBIA LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE.-----

4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA.- CERTIFIED.-----



5. at Washington, D.C.-----

6. the 7 day of MAY 2010.-----

7. by Secretary of the District of Columbia.-----

8. No. 229806.-----

9. Seal/Stamp.-----

10. Signature. (Firmado) Stephanie D. Scott.-----

SEGUNDA.-Que de conformidad con lo expuesto y atendiendo a las prescripciones del artículo 47 del Decreto 960 de 1970, el documento mencionado, contenidos en cuatro (4) folios útiles, quedan legalmente protocolizados ante el Notario Treinta y Ocho (38) del Círculo Bogotá, de manera que desde ahora quedan bajo su custodia y guarda para que surtan los efectos legales a que haya lugar y los interesados puedan consultarlos y obtener las copias que de el solicite.-

----- **HASTA AQUÍ EL CONTENIDO -DE LA MINUTA** -----

SE ADVIRTIÓ al (a los) otorgante (s) de esta Escritura de la **obligación que tiene (n) de leer la totalidad de su texto**, a fin de, verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados con el fin de aclarar, modificar o corregir lo que le(s) pareciere; la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto. -----

Se advierte igualmente la necesidad de diligenciar los espacios en blanco correspondientes a la información personal y de trabajo consignados en el espacio destinado para la firma de los suscriptores del instrumento publico, con el objeto de confrontar la información solicitada con el contenido de la escritura previo a la autorización de la misma. -----

En consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por error o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del (los) otorgante (s) y del notario. -----

En tal caso, de la existencia de estos, deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por el (los) que intervino (eron) en la inicial y sufragada por el (ellos) mismo (s). (Artículo 35 decreto ley 960 de 1.970).-----

ADVERTENCIA PARA TODOS LOS COMPARECIENTES QUE EXTIENDAN Y OTORGUEN INSTRUMENTOS, SEGÚN ART. 34 C.N., LEY 190 DE 1995,



LEY 333 DE 1996 Y LEY 365 DE 1997. Los comparecientes bajo la gravedad del juramento manifiestan clara y expresamente que todos los dineros, bienes muebles e inmuebles contenidos en este instrumento fueron adquiridos por medios y actividades lícitas. Así como el dinero con el que se

efectúa el pago de los gastos notariales. -----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. LEÍDO EL PRESENTE INSTRUMENTO POR EL OTORGANTE Y ADVERTIDO DE SU REGISTRO DENTRO DEL TÉRMINO DE LEY, ESTUVO DE ACUERDO CON ÉL LO ACEPTÓ EN LA FORMA COMO ESTÁ REDACTADO Y EN TESTIMONIO DE QUE LE DA SU ASENTIMIENTO Y APROBACIÓN LO FIRMA POR ANTE MÍ Y CONMIGO EL NOTARIO QUE DE TODO LO EXPUESTO DOY FE Y POR ELLO LO AUTORIZO.-----

CONSTANCIA: EL PRESENTE INSTRUMENTO SE EXTIENDE EN LAS SIGUIENTES HOJAS DE PAPEL NOTARIAL Nos.

/ 700037/ 836803/ 836810/ 836821/ / -----

DERECHOS NOTARIALES: RESOLUCIÓN No. 10301 DEL 17 DE DICIEMBRE DE 2.009. \$ 42,860 -----

CARLOS REINALDO OLARTE

C. C. No. 79782747 de Bogotá

ESTADO CIVIL: CASADO

DIRECCIÓN RESIDENCIA:

DIRECCIÓN OFICINA: Diagonal 34 No 5-28

TELÉFONO RESIDENCIA:

TELÉFONO OFICINA: 601-7700

CELULAR: 315 7901625

EL(LA) NOTARIO (A) TREINTA Y OCHO (38)

DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.

EDUARDO DURAN GOMEZ.



YanethG/201005163

EDUARDO DURAN GOMEZ

I
F
C
ic
C
A
N

010045

Traducción oficial de un documento que está
originalmente en ingles

Sello: "El Distrito de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mi, este día 7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario Publico, Distrito de Columbia.

Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011."

(Hay otra firma ilegible).

Apostilla adjunta:

Distrito de Columbia	
APOSTILLA	
(Convention de La Haya du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Lisa Renee Johnson
3. Actuando en calidad de:	Notario Publico en y para el Distrito de Columbia
4. Lleva el sello/estampilla de:	Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el Distrito de Columbia
<u>Certificado</u>	
5. En:	Washington D.C.
6. El:	Día 7 de mayo de 2010
7. Por:	El Secretario del Distrito de Columbia
8. Bajo el No.:	229806
9. Sello / estampilla:	Distrito de Columbia
10. Firma:	(Firmado) Stephanie D. Scott.

Traductor Oficial

JORGE E. SIERRA REYES

licencia 376 - 1993 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

160507
CDA OIGES/19
CDA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2010 MAY 27 A 10:17
CDA OIGES/19
DELE. REALIZACIONES
BOGOTA D.C.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

000047

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

The undersigned, **General Power**

El suscrito, **Poder General**

WYETH LLC

domiciled in

domiciliado en

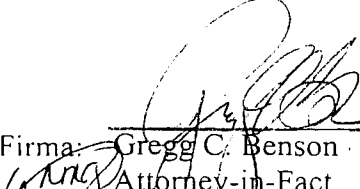
Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, 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.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, 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.

Alexander Agudelo
Angela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Gina Ariza
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mariana Franco
Monica Guacera
Alvaro Sabbagh

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

Signature/Firma:  Gregg C. Benson

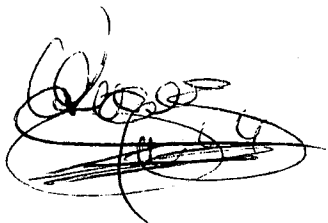
Attorney-in-Fact

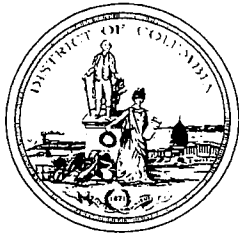
Date/Fecha: 4 MAY 2010

City/Country/Ciudad,País: GROTON, CONNECTICUT USA

The District of Columbia: SS
subscribed and sworn to before me
this 12 day of May 2010

Lisa Renee Johnson
Notary Public, DC
My commission expires 10/14/2011

A handwritten signature, possibly reading "C. Johnson", is written in dark ink. The signature is stylized with loops and is positioned in the lower-left area of the page.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

000048

1. *District of Columbia*
United States of America

LISA RENEE JOHNSON

2. This public document has been signed by _____
NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA

3. acting in the capacity of _____

LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE

4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.

6. the 7 day of MAY 2010

7. by Secretary of the District of Columbia

8. No. 229806

9. Seal/Stamp



86-PO138

10. Signature

Stephanie D. Scott

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date, May 6, 2010

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

GREGG C. BENSON

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as **ATTORNEY-IN-FACT** of **WYETH LLC**

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

3. That **WYETH LLC**

4. Que

having its principal place of business located in Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America

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.

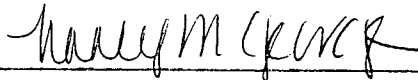
4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

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

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):

Power of Attorney executed on November 16, 2009

NOTARY PUBLIC (Signature):
Nancy M. George



NANCY M. GEORGE
Notary Public
My Commission Expires 30 June 2011

CONFIDENTIAL

SECRET

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

ES LA COPIA (FOTOCOPIA) NÚMERO =4= DE LA ESCRITURA
PÚBLICA =5101= DE FECHA =04= DE =JUNIO= DEL AÑO
=2010= TOMADA DE SU ORIGINAL QUE SE EXPIDE
CONFORME AL ARTÍCULO 41 DEL DECRETO 2148 DE 1983,
EN =7= HOJAS ÚTILES CON DESTINO A: =INTERESADO=

DADO EN BOGOTA, D.C. 07 DE JULIO DE 2011


RODOLFO REY BERMUDEZ
NOTARIO (38E) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ



PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application WYETH LLC, USSN 61/423,578, Filed: 15 December 2010 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from GELES, Kenneth G. to WYETH LLC, dated 28 January 2011 (28.01.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from ZHOU, Bin-Bing Stephen to WYETH LLC, dated 10 February 2011 (10.02.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from TCHISTIAKOVA, Lioudmila Gennadievna to WYETH LLC, dated 14 February 2011 (14.02.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from GAO, Yijie to WYETH LLC, dated 16 February 2011 (16.02.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from BARD, Joel to WYETH LLC, dated 16 February 2011 (16.02.2011)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application WYETH LLC, USSN 61/552,578, Filed: 28 October 2011 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i v)		an assignment from GELES, Kenneth G. to WYETH LLC, dated 01 December 2011 (01.12.2011)
VIII-2-2(i v)		an assignment from ZHOU, Bin-Bing Stephen to WYETH LLC, dated 23 November 2011 (23.11.2011)
VIII-2-2(i v)		an assignment from TCHISTIAKOVA, Lioudmila Gennadievna to WYETH LLC, dated 04 November 2011 (04.11.2011)
VIII-2-2(i v)		an assignment from GAO, Yijie to WYETH LLC, dated 04 November 2011 (04.11.2011)
VIII-2-2(i v)		an assignment from BARD, Joel to WYETH LLC, dated 04 November 2011 (04.11.2011)

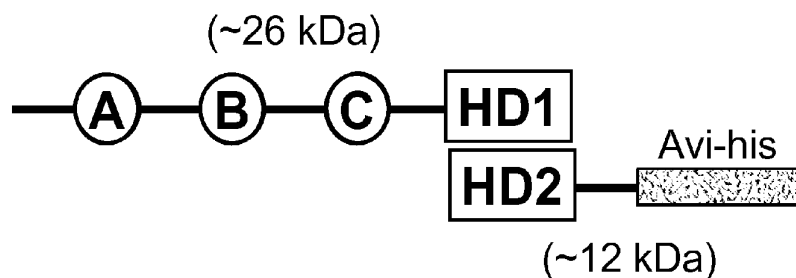


- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2011/055595
- (22) International Filing Date:
9 December 2011 (09.12.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/423,578 15 December 2010 (15.12.2010) US
61/552,578 28 October 2011 (28.10.2011) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): **WYETH LLC** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **GELES, Kenneth, G.** [US/US]; Pfizer Inc., 401 North Middletown Road, Building 140 - 4th Floor, Pearl River, NY 10965 (US). **ZHOU, Bin-Bing, Stephen** [US/US]; 18 Prescott Road, Ho Ho Kus, NJ 07423 (US). **TCHISTIAKOVA, Lioudmila, Gennadievna** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US). **GAO, Yijie** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US). **BARD, Joel** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US).
- (74) Agent: **POKRAS, Bruce A.**; Wyeth LLC, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTI-NOTCH1 ANTIBODIES

FIG. 1



(57) Abstract: The present invention provides for antibodies that bind to Notch1. The present disclosure also provides methods of making the antibodies, pharmaceutical compositions comprising these antibodies and methods of treating disorders with the antibodies and pharmaceutical compositions.



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, RS, 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))
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

ANTI-NOTCH1 ANTIBODIES

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to anti-notch1 antibodies. The present invention further relates to the methods of using such antibodies in the treatment of cancer.

BACKGROUND

Notch receptors control normal cell growth, differentiation, and death in
10 multicellular organisms through a signaling pathway that is triggered by ligand-induced proteolysis (Bray, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7(9):678-689, 2006). The mature Notch heterodimer after furin-like protease cleavage at site S1 is held in an auto-inhibited state by a juxtamembrane negative regulatory region (NRR) consisting of three Lin12/Notch repeats (LNR-A, B, C) and the heterodimerization (HD) domain. The HD domain is
15 divided into N-terminal (HD1) and C-terminal (HD2) halves by cleavage at site S1. Through an uncertain mechanism, binding of ligands of the Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) family to the N-terminal, EGF-repeat region relieves this inhibition and induces two successive additional cleavages at S2 near the C-terminal region HD-2, and S3 within transmembrane domain in Notch that are catalyzed by ADAM-type metalloproteinase
20 and gamma-Secretase, respectively (Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300). The latter cleavage releases the intracellular domain of Notch (Notch^{ICD}), permitting it to translocate to the nucleus and activate the transcription of target genes.

In mammalian cells, there are four known Notch receptors. Notch1-4 have broad,
25 overlapping patterns of expression in embryonic and adult tissues, and fulfill non-redundant roles during hematopoietic stem cell specification, T cell development, intestinal crypt cell specification and vascular development. Acquired abnormalities involving specific Notch1 receptors have been implicated in cancers, such as T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), breast cancer and lung cancer. In addition,
30 activated Notch1 is a potent inducer of leukemia in murine models and is over-expressed in various solid tumors, including non-small cell lung cancer, breast cancer and ovarian cancer.

Over 50% of T-ALL patients harbor mutations in the Notch1 receptor some of which result in constitutive cleavage of the receptor and production of the Notch1^{ICD} due

in part to Notch1 ligand-hypersensitivity or ligand-independent activation caused by alterations in or near the NRR auto-inhibitory domain. These mutations are categorized into 3 major classes. Class 1 mutations are single amino acid substitutions and small in-frame deletions or insertions in HD1. Class 2 mutations are longer insertions in the
5 distal region of HD2 that relocate the S2-metalloprotease cleavage site beyond the auto-inhibitory NRR domain. Class 3 mutations, also called juxtamembrane expansion (JMEs) mutations, occur from large insertions that displace the NRR away from the cell membrane.

Several strategies are in development to inhibit Notch signaling for therapeutic
10 purposes in cancer. One approach is to block the proteolytic release of intracellular Notch from the membrane by treatment with inhibitors of gamma-secretase (GSIs). Although GSIs have progressed into the clinic, they cannot distinguish individual Notch receptors and cause intestinal toxicity attributed to the inhibition of both Notch1 and Notch2. There is still a need in the art for novel anti-Notch1 therapies for the treatment
15 of cancer while providing reduced side effects, in particular, intestinal toxicity.

SUMMARY

In one embodiment, the present invention provides for antibodies that bind to Notch1, having a heavy chain variable region having a CDR1 region, a CDR2
20 region, and a CDR3 region from the heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 71.

In another embodiment, the present invention provides for antibodies that bind to Notch1, having a light chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a CDR3 region from the light chain variable region comprising SEQ ID
25 NO: 97.

The present invention also provides for antibodies that bind to Notch1 having
1) a heavy chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a CDR3 region from the heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 71, and
2) a light chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a CDR3
30 region from the light chain variable region comprising SEQ ID NO: 97.

Also provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 71. Further provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain variable region amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 71.

Also provided are antibodies that bind to Notch1 having a light chain variable region amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 97. Further provided are antibodies that bind to Notch1 having a light chain variable region amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 97.

5 Also provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 111. Further provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 111.

Also provided are antibodies having a light chain amino acid sequence that is
10 at least 90% identical to SEQ ID NO: 113. Further provided are antibodies having a light chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 113.

In a further embodiment, the invention provides for antibodies that bind to Notch1, having a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 71; and a light chain variable amino acid sequence that
15 is at least 90% identical to SEQ ID NO: 97. Further provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain variable region amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 71; and a light chain variable region amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 97.

In a further embodiment, the invention provides for antibodies that bind to
20 Notch1, having a heavy chain amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 111; and a light chain amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 113. Further provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 111, and a light chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 113.

25 In a further embodiment, the invention provides for antibodies, that bind to human Notch1, wherein the antibodies bind an epitope having at least 8 amino acid residues selected from 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, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 and Leu 1718.

30 In another embodiment, the present invention provides for antibodies that bind to Notch1, having a heavy chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a CDR3 region from the heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 115.

In another embodiment, the present invention provides for antibodies that bind to Notch1, having a light chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a CDR3 region from the light chain variable region comprising SEQ ID NO: 129.

5 The present invention also provides for antibodies that bind to Notch1 having
1) a heavy chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a
CDR3 region from the heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 115, and
2) a light chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a CDR3
region from the light chain variable region comprising SEQ ID NO: 129.

10 Also provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain
variable region amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO:
115. Further provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain
variable region amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 115.

 Also provided are antibodies that bind to Notch1 having a light chain variable
15 region amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 129.
Further provided are antibodies that bind to Notch1 having a light chain variable
region amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 129.

 Also provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain amino
acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 149. Further provided
20 are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain amino acid sequence as set
forth in SEQ ID NO: 149.

 Also provided are antibodies having a light chain amino acid sequence that is
at least 90% identical to SEQ ID NO: 151. Further provided are antibodies having a
light chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 151.

25 In a further embodiment, the invention provides for antibodies that bind to
Notch1, having a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least
90% identical to SEQ ID NO: 115; and a light chain variable amino acid sequence
that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 129. Further provided are antibodies
that bind to Notch1 having a heavy chain variable region amino acid sequence as
30 forth in SEQ ID NO: 115; and a light chain variable region amino acid sequence as
set forth in SEQ ID NO: 129.

 In a further embodiment, the invention provides for antibodies that bind to
Notch1, having a heavy chain amino acid sequence that is at least 90% identical to
SEQ ID NO: 149; and a light chain amino acid sequence that is at least 90%

identical to SEQ ID NO: 151. Further provided are antibodies that bind to Notch1 having a heavy chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 149, and a light chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 151.

In a further embodiment, the invention provides for antibodies, that bind to
5 human Notch1, wherein the antibodies bind an epitope having at least 8 amino acid residues selected from 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 and Lys 1718.

10 In another embodiment, the invention provides for antibodies that demonstrate higher inhibition of Notch1 activation of a mutant Notch1 receptor compared to inhibition of Notch1 activation of a native Notch1 receptor. It is further provided that the mutant Notch1 receptor has a mutation in the negative regulatory region (NRR). In a further embodiment, the mutation in the NRR is selected from
15 the group consisting of a class 1, a class 2, and a class 3 mutation. In a further embodiment, the mutation in the NRR is associated with cells having abnormal activation of Notch1. It is further provided that the cells are T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells. It is also provided that the T-ALL cells are selected from the group consisting of HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4 and
20 DND-41 cells.

Also provided are antibodies that bind to Notch1 and compete for binding to Notch1 with any of the antibodies described herein.

In a further embodiment, the invention provides for antibodies that bind to Notch1 where the antibodies are of isotype IgA, IgD, IgE, IgG, or IgM. Further
25 provided are antibodies that bind to Notch1 where the isotype is IgG, and wherein the subclass is IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4, or is derived therefrom. Also provided are antibodies that bind to Notch1 where the subclass is derived from IgG1.

In a further embodiment, the invention provides nucleic acids that encode any of the antibodies described herein, or that encode any of the heavy chains and/or
30 light chains of antibodies described herein. For example, in one embodiment, the invention provides nucleic acids having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 112. In a further embodiment, the invention provides nucleic acids having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 114. In another embodiment, the invention provides nucleic acids having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 150. In a

further embodiment, the invention provides nucleic acids having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 152.

In a further embodiment, the invention provides for a vector comprising any of the nucleic acids described herein. In a further embodiment, the invention provides
5 for host cells comprising any of the vectors described herein. In a further embodiment, the invention provides a process for producing any of the antibodies described herein comprising cultivating any host cells described herein and recovering the antibodies from the culture media. In a further embodiment, the invention provides host cells that recombinantly produce any of the antibodies
10 described herein. In one embodiment, any of the host cells described herein are isolated.

In a further embodiment, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising any of the antibodies described herein and pharmaceutically acceptable carriers. In a further embodiment, the invention
15 provides methods of treating disorders in subjects in need thereof, comprising administering to the subjects any of the antibodies or pharmaceutical compositions described herein. The invention further provides methods of treating disorders that are associated with abnormal activation of Notch1 in subjects in need thereof, comprising administering to the subjects any of the antibodies or pharmaceutical
20 compositions described herein. In a further embodiment, the invention provides methods of treating disorders, such as T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), non-small cell lung cancer (NSCLC), breast cancer and colon cancer, in subjects in need thereof, comprising administering to the subjects any of the antibodies or pharmaceutical compositions described herein. The invention further provides for a
25 method of treating disorders in subjects in need thereof, comprising administering to the subjects any of the antibodies or pharmaceutical compositions described herein in combination with one or more therapeutic agent.

In another embodiment, the invention provides for any of the antibodies disclosed herein for use in therapy. In a further embodiment, the invention provides
30 the use of any of the antibodies disclosed herein for the manufacture of medicaments for therapy. In a further embodiment, the invention provides for any of the antibodies disclosed herein for use in treating disorders that are associated with abnormal activation of Notch1 in subjects in need thereof. In a further embodiment, the invention provides for any of the antibodies disclosed herein for use in treating

disorders, such as T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), non-small cell lung cancer (NSCLC), breast cancer and colon cancer, in subjects in need thereof.

In a further embodiment, the invention provides for antibodies that bind to human, mouse and cynomolgus (hereinafter "cyno") Notch1, but do not bind to human Notch2. In another embodiment, the invention provides for antibodies that bind to human, mouse and cyno Notch1, but do not bind to human and mouse Notch3.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 shows a schematic diagram of recombinant, S1-cleaved, heterodimeric Notch1 NRR protein immunogen with Avi and His tags.

FIG. 2 shows recombinant human Notch1 NRR and Notch3 NRR domain swap chimeric constructs for epitope mapping of the anti-Notch1 antibodies rat 351-mIgG1, rat 438-mIgG1 and A2.

FIG. 3 shows a structural view of the rat 438 epitope on the human Notch1 NRR. FIG. 4 shows a structural view of the rat 351 epitope on the human Notch1 NRR. FIG. 5 shows a structural view of the A2 epitope on the human Notch1 NRR.

FIG. 6 shows the superposition of the structures of Notch1 NRR bound to rat 438 and A2 antibodies

FIG. 7 shows the superposition of the structures of Notch1 NRR (shown as ribbons) bound to rat 351 and A2 antibodies (shown as molecular surfaces).

FIG. 8 shows the neutralizing activity of humanized 438 VH1.1/VL1.8, rat 438-mIgG1 and A2 antibodies against Notch1 dependent signaling in human Notch1 reporter cells.

FIG. 9 shows the neutralizing activity of humanized 438 VH1.1/VL1.8, rat 438-mIgG1 and A2 antibodies against Notch1 dependent signaling in mouse Notch1 reporter cells.

FIG. 10 shows the neutralizing activity of rat 351 and A2 antibodies against human Notch1 signaling.

FIG. 11 shows the neutralizing activity of rat 351 and A2 antibodies against mouse Notch1 signaling.

FIG. 12 shows the neutralizing activity of humanized 351 variants, rat 351-mIgG1 and A2 antibodies against Notch1 dependent signaling in human Notch1 reporter cells.

FIG. 13 shows the neutralizing activity of humanized 351 variants, rat 351-mlgG1 and A2 antibodies against Notch1 dependent signaling in mouse Notch1 reporter cells.

FIG. 14A and 14B show structural views of the interaction interface between rat
5 351 and Notch1 NRR in the LNR-A region.

FIG. 15 shows the neutralization activity of rat 351, mutant rat 351 and A2 in co-culture reporter gene assays.

FIG. 16 shows representative epifluorescent images of CD31-Cy3 immunostaining of HUVEC-sprouts at day 10 of treatment with rat 438, rat 351 and A2,
10 and control medium alone and anti-VEGF antibody.

FIG. 17 shows representative confocal images of Isolectin B4-Alexa488 staining in a mouse retinal model of angiogenesis after treatment with rat 438-mlgG1, rat 351-mlgG1 and A2 antibodies, and controls anti-E.tenella antibody and no treatment.

FIG. 18 shows a Western blot analysis of protein extracts generated from
15 CCD1076SK human fibroblasts plated on recombinant human DLL4 ligand and treated with increasing concentrations of rat 351, rat 438 and A2, and control anti-E.tenella antibody.

FIG. 19 shows a Western blot analysis of protein extracts generated from HBP-ALL cells treated with increasing concentrations of humanized 438 VH1.1/VL1.8, rat
20 438-mlgG1, and control anti-E.tenella antibody.

FIG. 20 shows a Western blot analysis of protein extracts generated from T-ALL cell lines treated with increasing concentrations of rat 351-mlgG1, rat 438-mlgG1 and A2, and control anti-E.tenella antibody.

25 FIG. 21 shows immunohistochemical detection of Notch1 receptors and Jagged1 ligand in the 37622A1 NSCLC patient derived xenograft.

FIG. 22 shows a chromatogram indicating that the 37622A1 NSCLC patient derived xenograft possessed a G13V mutation in the human K-ras gene.

FIG. 23 shows western blot analysis of protein extracts generated from 37622A1
30 NSCLC patient derived xenografts treated with rat 438-mlgG1, A2 and control anti-E.tenella antibodies.

FIG. 24 shows a Western blot analysis of protein extracts generated in 87393A1 NSCLC patient derived xenografts treated with rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella antibodies.

FIG. 25 shows immunohistochemical detection of involucrin expression in 87393A1 NSCLC patient derived xenografts after treatment with rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella antibodies.

FIG. 26 shows a Western blot analysis of involucrin expression in 87393A1 NSCLC patient derived xenografts after treatment with rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella antibodies.

FIG. 27 shows histochemical identification of secretory goblet cells using Alcian Blue stain on the ileum section of mouse intestines from Calu-6 efficacy study treated with rat 438-mlgG1, A2, and control anti-E.tenella antibody.

FIG. 28 shows anti-Ki67 immunohistochemistry on mouse intestinal crypts from Calu-6 efficacy study treated with rat 438-mlgG1, A2 and control anti-E.tenella antibody.

FIG. 29 shows anti-Ki67 immunohistochemistry on mouse intestinal crypts from 87393A1 patient derived xenograft efficacy study treated with rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella antibodies.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to isolated antibodies, particularly human, humanized, chimeric and rat monoclonal antibodies that bind to Notch1. Further, the present disclosure provides for isolated antibodies that demonstrate higher inhibition of Notch1 activation of a mutant Notch1 receptor compared to inhibition of Notch1 activation of a native Notch1 receptor. The disclosure provides for isolated antibodies and methods of making such antibodies and pharmaceutical compositions containing the antibodies. The present disclosure further relates to immunoconjugates and bispecific molecules containing such antibodies. The disclosure also relates to methods of using the antibodies to inhibit Notch1 activation, and treat various diseases related to abnormal cell growth, such as cancer (e.g. T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), non-small cell lung cancer (NSCLC), colon cancer, breast cancer and ovarian cancer.

General Techniques

Unless otherwise indicated the methods and techniques of the present invention are generally performed according to conventional methods well known in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the present specification unless otherwise indicated. See, e.g., Sambrook et

al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), which are incorporated herein by reference.

Definitions

“Notch1” or “Notch-1” refers to native, variants, isoforms and species homologs of human Notch1 protein. Native human Notch1 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-1), a C terminal heterodimerization domain (HD-2), a transmembrane (TM) sequence and an intracellular domain (Notch1^{ICD}). The NCBI/GenBank accession number of the full length human Notch1 is NM_017617.2

“Notch1 negative regulatory region”, or “Notch1 NRR” as used herein, unless otherwise indicated, refers to any native or synthetic polypeptide region of Notch1 consisting of the three Lin12 domains and the amino acid sequence or sequences located between the three Lin12 domains, plus the HD1 and HD2 domains of Notch1. In one embodiment, the “Notch1 NRR” includes the three Lin12 domains and two heterodimerization domains HD-1, and HD-2, wherein the HD-1 and HD-2 domains of Notch1 are covalently bonded and not yet cleaved by the furin-like protease (before S1 cleavage). In another embodiment, the “Notch1 NRR” includes the three Lin12 domains and the two heterodimerization domains HD-1, and HD-2, wherein the HD-1 and HD-2 domains are non-covalently bonded (after S1 cleavage). In one aspect of this embodiment, the S2 site within the HD-2 domain has not been cleaved by the ADAM-type metalloproteases. In another particular aspect of this embodiment, the S2 site within the HD-2 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).

An “antibody” is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term encompasses not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also fragments (e.g., antigen binding portions) thereof (such

as Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), single chain (ScFv) and domain antibodies such as shark and camelid antibodies), and fusion proteins comprising an antibody portion (such as domain antibodies), and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site. An antibody includes an antibody
5 of any class, such as IgG, IgA, or IgM (or sub-class thereof), and the antibody need not be of any particular class. Depending on the antibody amino acid sequence of the constant domain of its heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes (isotypes) of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses, e.g., IgG1,
10 IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

An "isolated antibody", as used herein, is intended to refer to an antibody that is
15 substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (e.g., an isolated antibody that specifically binds Notch1 is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than Notch1). An isolated antibody that specifically binds Notch1 may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as Notch-1 molecules from other species. Moreover, an isolated antibody may be substantially free
20 of other cellular material and/or chemicals.

As used herein, "monoclonal antibody" refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being
25 directed against a single antigenic site.

"Humanized" antibody refers to forms of non-human (e.g. murine) antibodies that are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains, or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Preferably, humanized
30 antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FW) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human

residues. Furthermore, the humanized antibody may comprise residues that are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences, but are included to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FW regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Other forms of humanized antibodies have one or more CDRs (L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2, or H-CDR3) which are altered with respect to the original antibody, which are also termed one or more CDRs "derived from" one or more CDRs from the original antibody.

"Human antibody" or "fully human antibody" is 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 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*). This definition of a human antibody includes antibodies comprising at least one human heavy chain polypeptide or at least one human light chain polypeptide. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art.

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 term "recombinant antibody", as used herein, includes all antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means. Such recombinant antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the VH and VL regions of the recombinant antibodies are sequences

that, while derived from and related to germline VH and VL sequences, may not naturally exist within the antibody germline repertoire *in vivo*.

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
5 specifically to an antigen."

As known in the art, the term "Fc region" is used to define a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain (CH2+CH3). The "Fc region" may be a native sequence Fc region or a variant Fc region.

A "native sequence Fc region" comprises an amino acid sequence identical to
10 the amino acid sequence of an Fc region found in nature. A "variant Fc region" comprises an amino acid sequence which differs from that of a native sequence Fc region by virtue of at least one amino acid modification, yet retains at least one function of the native sequence Fc region.

The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to
15 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 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and Fc γ RIV subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. Fc γ RII receptors include Fc γ RIIA (an "activating receptor") and Fc γ RIIB (an "inhibiting receptor"), which
20 have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor Fc γ RIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. As will be appreciated by those of skill in the art, inhibiting receptor Fc γ RIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. FcRs have been extensively reviewed
25 and are well known to those of skill in the art. 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, and the extended half life of IgGs.

The term "binds" refers to an affinity between two molecules, for example, an
30 antigen and an antibody. An antibody that "specifically binds to Notch1" refers to a preferential binding of an antibody to Notch1 antigen in a sample comprising multiple different antigens, with a difference in K_D of at least 100 fold or preferably 1,000 fold.

The term "high affinity" refers to an antibody having a K_D of 1×10^{-6} M or less, more preferably having a K_D of 1×10^{-8} M or less. Affinity can be measured using, for example, surface Plasmon resonance.

"Epitope" includes any protein determinant capable of specific binding to an immunoglobulin or T-cell receptor. Epitopic determinants usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics.

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.

The terms "polypeptide", "oligopeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to chains of amino acids of any length, preferably, relatively short (e.g., 10-100 amino acids). The chain may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and/or may be interrupted by non-amino acids. It is understood that the polypeptides can occur as single chains or associated chains.

As known in the art, "polynucleotide," or "nucleic acid," as used interchangeably herein, refer to chains of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a chain by DNA or RNA polymerase.

A "variable region" of an antibody refers to the variable region of the antibody light chain or the variable region of the antibody heavy chain, either alone or in combination. As known in the art, the variable regions of the heavy and light chain each consist of four framework regions (FW) connected by three complementarity determining regions (CDRs) also known as hypervariable regions. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FWs and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies.

A "CDR" of a variable domain are amino acid residues within the variable region that are identified in accordance with the definitions of the Kabat, Chothia, the accumulation of both Kabat and Chothia, AbM, contact, and/or conformational definitions or any method of CDR determination well known in the art. Antibody CDRs may be identified as the hypervariable regions originally defined by Kabat et al. See, 5 e.g., Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. The positions of the CDRs may also be identified as the structural loop originally described by Chothia and others. See, e.g., Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883. Other approaches to CDR identification 10 include the "AbM definition," which is a compromise between Kabat and Chothia and is derived using Oxford Molecular's AbM antibody modeling software (now Accelrys®), or the "contact definition" of CDRs based on observed antigen contacts, set forth in MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. In another approach, referred to herein as the "conformational definition" of CDRs, the positions of the CDRs may be 15 identified as the residues that make enthalpic contributions to antigen binding. See, e.g., Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Still other CDR boundary definitions may not strictly follow one of the above approaches, but will nonetheless overlap with at least a portion of the Kabat CDRs, although they may be shortened or lengthened in light of prediction or experimental findings that particular 20 residues or groups of residues or even entire CDRs do not significantly impact antigen binding. As used herein, a CDR may refer to CDRs defined by any approach known in the art, including combinations of approaches. The methods used herein may utilize CDRs defined according to any of these approaches. For any given embodiment containing more than one CDR, the CDRs may be defined in accordance with any of 25 Kabat, Chothia, extended, AbM, contact, and/or conformational definitions.

A "constant region" of an antibody refers to the constant region of the antibody light chain or the constant region of the antibody heavy chain, either alone or in combination.

A "host cell" includes an individual cell or cell culture that can be or has been a 30 recipient for vector(s) for incorporation of polynucleotide inserts. Host cells include progeny of a single host cell, and the progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic DNA complement) to the original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. A host cell includes cells transfected *in vivo* with a polynucleotide(s) of the present disclosure.

As used herein, "vector" means a construct, which is capable of delivering, and, preferably, expressing, one or more gene(s) or sequence(s) of interest in a host cell. Examples of vectors include, but are not limited to, viral vectors, naked DNA or RNA expression vectors, plasmid, cosmid or phage vectors, DNA or RNA expression vectors
5 associated with cationic condensing agents, DNA or RNA expression vectors encapsulated in liposomes, and certain eukaryotic cells, such as producer cells.

As used herein, "expression control sequence" means a nucleic acid sequence that directs transcription of a nucleic acid. An expression control sequence can be a promoter, such as a constitutive or an inducible promoter, or an enhancer. The
10 expression control sequence is operably linked to the nucleic acid sequence to be transcribed.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" or "pharmaceutical acceptable excipient" includes any material which, when combined with an active ingredient, allows the ingredient to retain biological activity and is non-reactive with the
15 subject's immune system. Examples include, but are not limited to, any of the standard pharmaceutical carriers such as a phosphate buffered saline solution, water, emulsions such as oil/water emulsion, and various types of wetting agents. Preferred diluents for aerosol or parenteral administration are phosphate buffered saline (PBS) or normal (0.9%) saline. Compositions comprising such carriers are formulated by well known
20 conventional methods.

An "individual" or a "subject" is a mammal, more preferably, a human. Mammals also include, but are not limited to, farm animals, sport animals, pets, primates, horses, dogs, cats, mice and rats.

An "isolated protein", "isolated polypeptide" or "isolated antibody" is a protein,
25 polypeptide or antibody that by virtue of its origin or source of derivation (1) is not associated with naturally associated components that accompany it in its native state, (2) is free of other proteins from the same species, (3) is expressed by a cell from a different species, or (4) does not occur in nature. Thus, a polypeptide that is chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the cell from which it
30 naturally originates will be "isolated" from its naturally associated components. A protein may also be rendered substantially free of naturally associated components by isolation, using protein purification techniques well known in the art.

Notch1 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 (Notch1^{ICD}).

5

Anti-Notch1 antibodies that bind to the NRR

It is within the contemplation of the current disclosure that antibodies that bind to the Notch1 domain with a high affinity may reduce Notch1 signal transduction, and therefore may demonstrate biological activity *in vitro* and *in vivo* to inhibit cancer cell growth, in particular, T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), non-small cell lung cancer (NSCLC), breast cancer, colon cancer and ovarian cancer. 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 rat with an immunogen followed by hybridoma cloning of the antibodies thus generated and assaying the cloned antibodies by a variety of assays. For example, solid-phase ELISA immunoassay, immunoprecipitation, BIAcore, FACS, and Western blot analysis are among many assays that may be used to identify an antibody that specifically reacts with Notch1. The Notch1 binding affinity of the antibodies selected according to the ELISA assay can be measured on a surface plasma resonance Biacore® instrument.

The anti-Notch1 antibodies of the current disclosure 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-Notch1 antibodies generated by hybridoma technologies.

It is within the contemplation of the current disclosure 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). Hybridomas that may be used as a source of antibodies encompass all
5 derivatives, progeny cells of the parent hybridomas that produce monoclonal antibodies specific for Notch1, 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 or body fluids, by conventional immunoglobulin purification procedures.

10

Humanization of anti-Notch1 antibodies generated by immunization in a host animal.

It is within the contemplation of the current disclosure that anti Notch1 antibodies of the disclosure, wherein the antibodies are generated by immunization in a host animal can be manipulated in many ways to improve their biological activity and
15 pharmaceutical properties. One way of such manipulation is humanization.

Methods of humanizing antibodies are well known to those of ordinary skill in the art. In general, there are four basic 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.,
20 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.

A number of "humanized" antibody molecules comprising an antigen-binding site derived from a non-human immunoglobulin have been described in the literature,
25 including chimeric antibodies having rodent or modified rodent V regions and their associated CDRs fused to human constant domains; rodent CDRs grafted into a human supporting framework region (FR) prior to fusion with an appropriate human antibody constant domain; and rodent CDRs supported by recombinantly engineered rodent framework regions. Such "humanized" molecules are designed to minimize
30 unwanted immunological response toward rodent anti-human antibody molecules which limits the duration and effectiveness of therapeutic applications of those moieties in human recipients.

Human anti-Notch1 antibodies

It is within the contemplation of the current disclosure that fully human anti-Notch1 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 antibody) or more robust immune response may also be used for generation of humanized or human antibodies. Examples of such technologies 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 disclosure that fully human anti-Notch1 antibodies may be obtained recombinantly following general methods of phage display technology, as will be readily apparent to those of skill in the art. Alternatively, the phage display technology can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors.

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. 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-Notch1 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. Other host cells, such as transgenic plant cells or transgenic milk cells may also be used.

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, 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-Notch1 monoclonal antibody herein.

Antibody variable regions can also be modified by CDR grafting. Because CDR sequences are predominantly 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.

Accordingly, another aspect of the disclosure pertains to an isolated monoclonal antibody, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences as described herein, and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences as described herein. Thus, such antibodies contain the VH and VL CDR sequences of the monoclonal antibodies described herein, 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 VH and/or VL 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 using *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, two, three, four or five residues within a CDR region are modified.

Epitope Mapping

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. Determining the amino acid sequence of a linear epitope can be accomplished by utilizing techniques well known in the art. A non-linear epitope which is constituted by several sequentially discontinuous

segments or noncontiguous residues that are brought together by the folding of the antigen to its native structure is known as a conformational epitope.

Mapping of conformational epitopes depends on the interaction of antibody to antigen in its native conformation. A number of techniques well known in the art are useful in determining conformational epitopes. For example, co-crystallization 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 can provide powerful evidence and a vivid picture for antibody binding epitopes. The epitope or the set of epitopes that each of the anti-Notch1 antibodies bind to may be determined according to the above mapping methods or others generally known in the art.

Conservative substitutions

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.

Affinity matured anti-Notch1 antibodies

The disclosure includes affinity matured embodiments. For example, affinity matured antibodies can be produced by procedures known in the art (such as 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). Such methods may be used for adjusting the affinity of an antibody and for characterizing a CDR.

Post translational modification of anti-Notch1 antibodies

5 Antibodies can also be modified by post translational modifications, including, but not limited to glycosylation with different sugars, acetylation, and phosphorylation by techniques are well known in the art.

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

Anti-Notch1 antibodies with modified constant region

 In some embodiments of the disclosure, the antibody comprises a modified
15 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 reduced activities (compared to the unmodified antibody) in any one or more of the following: triggering complement mediated lysis, stimulating antibody-dependent cell
20 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., 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
25 al., Immunological Reviews 163:59-76 (1998).

 In some embodiments, the antibody comprises a human heavy chain IgG1 constant region comprising the following mutations: L234A/L235A/G237A in the lower hinge region resulting in substantially reduced ADCC and CDC activities. See for example US20090155256.

30 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 pattern, again to alter one or more functional properties of the antibody.

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 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 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.

Fusion protein

The disclosure also encompasses fusion proteins comprising one or more fragments or regions from the antibodies or polypeptides of this disclosure. 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 disclosure. 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 disclosure. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises one or more CDR(s) of the antibodies of the current disclosure. For purposes of this disclosure, 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.

Bispecific Molecules

5 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
10 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 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)
15 to one or more other binding molecules, such as another antibody, antibody fragment, peptide or binding mimetic, such that a bispecific molecule results.

Single-Chain Antibodies

 An antibody of the disclosure can be a single-chain antibody (scFv) in which the
20 heavy and light chain variable regions (Fv region) have been connected by a flexible linker to form a single polypeptide chain, which forms an antigen-binding region. Such single-chain antibodies may be prepared by fusing DNA encoding a peptide linker between DNAs encoding the two variable domain polypeptides (VL and VH). The resulting polypeptides can fold back on themselves to form antigen-binding monomers,
25 or they can form multimers (e.g., dimers, trimers, or tetramers), depending on the length of a flexible linker between the two variable domains (Kortt et al. (1997) Prot. Eng. 10:423; Kortt et al. (2001) Biomol. Eng. 18:95-108). By combining different VL and VH-comprising polypeptides, one can form multimeric scFvs that bind to different epitopes (Kriangkum et al. (2001) Biomol. Eng. 18:31-40). Single chain antibodies can be
30 produced using various techniques known in the art.

Immunoconjugates

An antibody of the disclosure can be an immunoconjugate or antibody-drug conjugates (ADC). Immunoconjugates combine the binding specificity of monoclonal antibodies with the potency of chemotherapeutic agents.

5

Polynucleotides encoding the anti-Notch1 antibodies

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

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

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

Polynucleotides complementary to any such sequences are also encompassed by the present disclosure. Polynucleotides may be single-stranded (coding or
20 antisense) 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 disclosure, and a polynucleotide may,
25 but need not, 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
5 for maximum correspondence.

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
10 that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present disclosure. Further, alleles of the genes comprising the polynucleotide sequences provided herein are within the scope of the present disclosure. 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,
15 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 disclosure can be obtained using chemical synthesis, recombinant methods, or PCR.

20 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. 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
25 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 target for a particular restriction endonuclease, and/or may carry genes for a marker that can be used in selecting clones containing the vector.

Expression vectors generally are replicable polynucleotide constructs that
30 contain a polynucleotide according to the disclosure. 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. 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).

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 disclosure 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. 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.

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, anti-cancer 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
5 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.

10 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.

15 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
20 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-
25 substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic 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, chlorprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, procaine
30 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, fendizole, 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, pantoic, propionic, anthranilic, mesylic, orotic, oxalic, oxalacetic, oleic, stearic, salicylic, aminosalicilic, 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, glycylglycine, 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-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-
 5 [(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]ethanesulfonic acid, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-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)
 10 dihydrate, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid, N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(4-butanethanesulfonic acid), N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid, N-tris(hydroxymethyl)methyl-4-aminobutanethanesulfonic acid, N-(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid, 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid, 3-
 15 (cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid, 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid, N-(2-acetamido)iminodiacetic acid, 4-(cyclohexylamino)-1-butanethanesulfonic 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
 20 pharmaceutically acceptable anti-oxidant. Examples of pharmaceutically acceptable 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;
 25 and (3) metal chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (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
 30 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.

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 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 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 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 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. 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.

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.

5 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
10 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.

 Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a
15 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
20 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
25 particular 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.

 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
30 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-Notch1 antibody 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.

5 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
10 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
15 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
20 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.

25 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
30 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.

A "therapeutically effective dosage" of an anti-Notch antibody of the disclosure
5 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 Notch1-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
10 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
15 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.

20 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 of the disclosure include intravenous, intramuscular, intradermal, intraperitoneal,
25 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,
30 transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion.

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.

The active compounds can be prepared with carriers that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including
5 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 those skilled in the art. See, e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery
10 Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Uses and Methods of the Disclosure

The antibodies, particularly the human antibodies, antibody compositions and methods of the present disclosure have numerous *in vitro* and *in vivo* diagnostic and
15 therapeutic utilities involving the diagnosis and treatment of Notch1 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-human animals. Non-human animals include all vertebrates, e.g., mammals and non-
20 mammals, such as non-human primates, sheep, dogs, cats, cows, horses, chickens, amphibians, and reptiles. Preferred subjects include human patients having disorders mediated by Notch1 activity. The methods are particularly suitable for treating human patients having a disorder associated with abnormal Notch1 expression or activation. When antibodies to Notch1 are administered together with another agent, the two can
25 be administered in either order or simultaneously.

Given the specific binding of the antibodies of the disclosure for Notch1, the antibodies of the disclosure can be used to specifically detect Notch1 expression on the surface of cells and, moreover, can be used to purify Notch1 via immunoaffinity purification.

30 Furthermore, the antibodies, antibody compositions and methods of the present disclosure can be used to treat a subject with abnormal Notch1 expression, e.g., a cancer. In one particular embodiment, the cancer is T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). In another particular embodiment, the cancer is non-small cell lung cancer (NSCLC), breast cancer, colon cancer or ovarian cancer.

Other types of abnormal Notch 1 expression that may be treated by the antibodies of the disclosure 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, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), 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) 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.

Human anti-Notch1 antibodies 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. The antibody and the agent can be prepared for simultaneous, sequential or separate administration. Such therapeutic agents include, among others, anti-neoplastic agents such as docetaxel, 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
5 mg/ml dose once every 21 days. Co-administration of the human anti-Notch1 antibodies 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.

10 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
15 agent or a radiotoxic agent, or one or more additional antibodies of the disclosure (e.g., a human antibody having a complementary activity which binds to an epitope in the Notch1 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
20 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
25 references, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference.

30

EXAMPLES

Example 15 Generation of recombinant human and mouse Notch1 protein immunogens

A. Expression and purification of human and mouse Notch1 NRR proteins

cDNA constructs encoding the Notch1 NRR region, amino acids of SEQ ID 2 for human Notch1 and amino acids of SEQ ID 6 for mouse Notch1 shown in **Table 1**, with a
10 signal peptide at the N-terminus and Avi and His6 tag at the C-terminus, were cloned into the expression vector pSMED2. These constructs were transiently transfected into COS or Chinese hamster ovary (CHO) cells and the secreted protein in conditioned media were analyzed on SDS-PAGE. After processing at the S1 cleavage site, the N-terminal ~26 kDa (LNR-A, B, C and HD1) and C-terminal ~12 kDa (HD2 and Avi_His
15 tag) halves of the Notch1 NRR domain remain associated through non-covalent interactions to form a heterodimeric complex, as shown in **FIG. 1**. S1 processing of the Notch1 NRR was determined to be about 50% or less in samples prepared from CHO cells.

To enhance processing at the S1 cleavage site, the Notch1 NRR expression
20 construct was transfected into CHO-PACE cells (Harrison et, al, Semin Hematol. 1998 Apr;35(2 Suppl 2):4-10) and stable cell lines with the highest expression and complete processing of Notch1 NRR were selected. Culture of these cell lines was scaled up for the collection of conditioned media (CM) from which Notch1 NRR proteins were purified.

Concentrated CHO-PACE CM was loaded onto a 27ml Qiagen Ni-NTA
25 Superflow column that was equilibrated with PBS at a flow rate of 1ml/min at 4°C. After loading, the column was washed with 10 Column Volumes (CV) of PBS, followed by 10CV of Buffer A (300mM NaCl, 50mM Na₂HPO₄, pH 8.0), and followed by 10CV 4% Buffer B (500mM imidazole, 300mM NaCl, 50mM Na₂HPO₄, pH 8.0). The human Notch1 Avi_His was eluted using a linear gradient to 100% Buffer B over 10CV.
30 Fractions containing human Notch1 Avi_His were pooled, filtered and dialyzed to PBS calcium magnesium free (CMF). The protein was further purified with two rounds of size exclusion chromatography on a tandem Superdex-200 and Superdex-75 columns (total CV=600ml) equilibrated with TBS +1mM CaCl₂, 0.1mM ZnCl₂. SDS-PAGE analysis of purified human and mouse Notch1 NRR_Avi_His tag proteins show that > 90% of the

purified protein was correctly cleaved into the predicted Notch1 NRR N-terminal and C-terminal peptide sizes. Light scattering (SEC-MALS) analysis of purified human and mouse Notch1 NRR proteins showed a peak at the expected molecular weight of 40 kDa on a size exclusion column under native conditions, indicating proper formation of an intact Notch1 NRR heterodimer.

B. Expression and purification of cyno-Notch1 NRR-Fc fusion protein

A cDNA construct encoding the cyno Notch1 NRR region, amino acids of SEQ ID 10 for cyno Notch1 shown in **Table 1**, with a signal peptide at the N-terminus and human IgG1 Fc fragment at the C-terminus, was cloned into the expression vector pSMED2. This construct was transiently co-transfected into 293 (Invitrogen) cells with a soluble PACE overexpressing construct (Harrison et, al, Semin Hematol. 1998 Apr;35(2 Suppl 2):4-10) to ensure complete processing of the cyno-Notch1 NRR region.

Conditioned medium was harvested from transfected cells and the cyno-Notch1 NRR-Fc fusion protein was purified via protein A affinity purification. Purified protein was then dialyzed into TBS containing 1mM CaCl₂. SDS-PAGE analysis showed two polypeptide fragments at expected sizes of 12Kd (HD1) and 37Kd (HD2+Fc), with >95% purity of the protein preparation. Analytical SEC under native conditions showed a single peak around 50 K_D, representing a heterodimer of the two fragments described above, with minimal amount of aggregates (<1%) in the preparation.

Table 1 below provides the amino acid and nucleotide sequences of human, mouse and cyno Notch1 NRR regions.

Table 1. Amino acid and nucleotide sequences of human, mouse and cyno Notch1 NRR regions.

SEQ ID NO:		
1	Human Notch1 NRR amino acid sequence (amino acids in lower case type represent the Gp1b signal sequence and Avi_His tag)	mpIIIIIIlpsplhpGGAGRDIPPLIEEACELPECQE DAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDP WKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSSQCNSAGCLF DGFDCQRAEGQCNPYDQYCKDHFSDGHCD QGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVV VLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRD AHGQQMIFPYYGREEELRKHPKRAAEGWAAP DALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPM DVR GSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFLG ALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFM gggsgggIndifeaqkiewheggpphhhhh

2	Human Notch1 NRR amino acid sequence	GGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSL QCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQ CWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAE GQCNP LYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECE WDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLR NSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFP YYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKA SLLPGGSEGGRRRRELDPM DVRSIVYLEIDN RQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSLNI PYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFM
3	Human Notch1 NRR nucleotide sequence (nucleotides in lower case type represent the signal peptide Avi_His tag coding sequence)	atgctctcctcctcttgcctcctcctgccaagcccttacacgc gGGTGGGGCCGGGCGCGACATCCCCCGCG CGCTGATCGAGGAGGCGTGCGAGCTGCCCG AGTGCCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCT GCAGCCTGCAGTGCAACAACCACGCGTGCG GCTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACT TCAATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCACTC TCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGC CACTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGC TGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTG CGGAAGGCCAGTGCAACCCCTGTACGACC AGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGC ACTGCGACCAAGGGCTGCAACAGCGCGGAGT GCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGGAG CATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCGGCACG CTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGCCGGAG CAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTCCTGC GGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACACCAACG TGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGGCCAGC AGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGCGAGGA GGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGC CGCCGAGGGCTGGGCCGACCTGACGCCCT GCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCC TGGTGGCAGCGAGGGTGGGCGGCGGCGGA GGGAGCTGGACCCCATGGACGTCCGCGGCT CCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCA GTGTGTGCAGGCCTCCTCGCAGTGCTTCCA GAGTGCCACCGACGTGGCCGATTCTCTGGG AGCGCTCGCCTCGCTGGGCAGCCTCAACAT CCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGA GACCGTGGAGCCGCCCCCGCCGGCGCAGC TGCACTTCATGggagggggaagcggaggcggactgaa cgacatctcgaggctcagaaaatcgatggcacgaaggtggc ccaccacatcatcatcatcatcac
4	Human Notch1 NRR nucleotide sequence	GGTGGGGCCGGGCGCGACATCCCCCGCC GCTGATCGAGGAGGCGTGCGAGCTGCCCGA GTGCCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCTG CAGCCTGCAGTGCAACAACCACGCGTGCGG CTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACT CAATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCACTC CTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGC CACTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGC TGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTG CGGAAGGCCAGTGCAACCCCTGTACGACC AGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGC

		ACTGCGACCAGGGCTGCAACAGCGCGGAGT GCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGGAG CATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCGGCAGC CTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGCCGGAG CAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTCCTGC GGGAGCTCAGCCGCGTGTGTCACACCAACG TGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGGCCAGC AGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGCGAGGA GGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGC CGCCGAGGGCTGGGCCGACCTGACGCCCT GCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCC TGGTGGCAGCGAGGGTGGGCGGCGGCGGA GGGAGCTGGACCCCATGGACGTCCGCGGCT CCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCA GTGTGTGCAGGCCTCCTCGCAGTGCTTCCA GAGTGCCACCGACGTGGCCGCATTCTGGG AGCGCTCGCCTCGCTGGGCAGCCTCAACAT CCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGA GACCGTGGAGCCGCCCCCGCCGGCGCAGC TGACTTCATG
5	Mouse Notch1 NRR amino acid sequence (amino acids in lower case type represent the Gp1b signal sequence and Avi_His tag of purified protein)	mpIIIIIIpsplhpGGAGRDIPPPQIEEACELPECQV DAGNKVCNLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDP WKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSSQCNSAGCLF DGFDCQLTEGQQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQ GCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVLVVL LPPDQLRNNSFHFLRELSHVLHTNVVFKRDAQ GQQMIFPYYGHEEELRKHPIKRSTVGWATSSL LPGTSGGRQRRELDPMDIRGSIVYLEIDNRQC VQSSSQCFQSATDVAAFLGALASLGSLNIPYKI EAVKSEPVEPPLPSQLHLMggggsgggIndifeaqkie wheggpphhhhh
6	Mouse Notch1 NRR amino acid sequence	GGAGRDIPPPQIEEACELPECQVDAGNKVCNL QCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQ CWKYFSDGHCDSSQCNSAGCLFDGFDCQLTEG QCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEW DGLDCAEHVPERLAAGTLVLVLLPPDQLRNN SFHFLRELSHVLHTNVVFKRDAQGQQMIFPYY GHEEELRKHPIKRSTVGWATSSLLPGTSGGRQ RRELDPMDIRGSIVYLEIDNRQCVQSSSQCFQ SATDVAAFLGALASLGSLNIPYKIEAVKSEPVEP PLPSQLHLM
7	Mouse Notch1 NRR nucleotide sequence (nucleotides in lower case type represent the Gp1b signal sequence and Avi_His tag of purified protein)	atgcctctcctccttctgctgctcctgctccaagccccttacacgc gGGTGGCGCTGGGCGCGACATTCCCCCACC GCAGATTGAGGAGGCCTGTGAGCTGCCTGA GTGCCAGGTGGATGCAGGCAATAAGGTCTG CAACCTGCAGTGTAATAATCACGCATGTGGC TGGGATGGTGGCGACTGCTCCCTCAACTTCA ATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCAGTCTCT ACAGTGCTGGAAGTATTTTAGCGACGGCCAC TGTGACAGCCAGTGCAACTCGGCCGGCTGC CTCTTTGATGGCTTCGACTGCCAGCTCACCG AGGGACAGTGCAACCCCTGTATGACCAGTA CTGCAAGGACCACTTCAGTGATGGCCACTGC GACCAGGGCTGTAACAGTGCCGAATGTGAG

		TGGGATGGCCTAGACTGTGCTGAGCATGTAC CCGAGCGGCTGGCAGCCGGCACCCCTGGTG CTGGTGGTGCTGCTTCCACCCGACCAGCTA CGGAACAACCTCCTTCCACTTTCTGCGGGAGC TCAGCCACGTGCTGCACACCAACGTGGTCTT CAAGCGTGATGCGCAAGGCCAGCAGATGAT CTTCCCGTACTATGGCCACGAGGAAGAGCT GCGCAAGCACCCAATCAAGCGCTCTACAGT GGGTTGGGCCACCTCTTCACTGCTTCCTGGT ACCAGTGGTGGGCGCCAGCGCAGGGAGCT GGACCCCATGGACATCCGTGGCTCCATTGTC TACCTGGAGATCGACAACCGGCAATGTGTGC AGTCATCCTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCAC CGATGTGGCTGCCTTCCCTAGGTGCTCTTGCG TCACTTGGCAGCCTCAATATTCCTTACAAGAT TGAGGCCGTGAAGAGTGAGCCGGTGGAGCC TCCGCTGCCCTCGCAGCTGCACCTCATGgga gggggaagcggaggcggactgaacgacatcttcagggtcag aaaatcgaatggcacgaagggtggccaccacatcatcatca tcac
8	Mouse Notch1 NRR nucleotide sequence	GGTGGCGCTGGGCGCGACATTCCCCCACCG CAGATTGAGGAGGCCTGTGAGCTGCCTGAG TGCCAGGTGGATGCAGGCAATAAGGTCTGC AACCTGCAGTGTAATAATCACGCATGTGGCT GGGATGGTGGCGACTGCTCCCTCAACTTCAA TGACCCCTGGAAGAACTGCACGCAGTCTCTA CAGTGCTGGAAGTATTTTAGCGACGGCCACT GTGACAGCCAGTGCAACTCGGCCGGCTGCC TCTTTGATGGCTTCGACTGCCAGCTCACCGA GGGACAGTGCAACCCCTGTATGACCACTA CTGCAAGGACCACTTCAGTGATGGCCACTGC GACCAGGGCTGTAACAGTGCCGAATGTGAG TGGGATGGCCTAGACTGTGCTGAGCATGTAC CCGAGCGGCTGGCAGCCGGCACCCCTGGTG CTGGTGGTGCTGCTTCCACCCGACCAGCTA CGGAACAACCTCCTTCCACTTTCTGCGGGAGC TCAGCCACGTGCTGCACACCAACGTGGTCTT CAAGCGTGATGCGCAAGGCCAGCAGATGAT CTTCCCGTACTATGGCCACGAGGAAGAGCT GCGCAAGCACCCAATCAAGCGCTCTACAGT GGGTTGGGCCACCTCTTCACTGCTTCCTGGT ACCAGTGGTGGGCGCCAGCGCAGGGAGCT GGACCCCATGGACATCCGTGGCTCCATTGTC TACCTGGAGATCGACAACCGGCAATGTGTGC AGTCATCCTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCAC CGATGTGGCTGCCTTCCCTAGGTGCTCTTGCG TCACTTGGCAGCCTCAATATTCCTTACAAGAT TGAGGCCGTGAAGAGTGAGCCGGTGGAGCC TCCGCTGCCCTCGCAGCTGCACCTCATG
9	Cyno-Notch1 NRR-Fc amino acid sequence (amino acids in lower case type represent the signal sequence and hlgG1 Fc fragment of purified protein)	mgwsciiiflvatgahsGGAGRDIPPLIEEACELPE CQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNF NDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDQNSAG CLFDGFDQCRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGH CDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLV VVVLMPPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFK

		RDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWA APEALLGQVKASLLPGGGGGGRRRRELDPM VRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPA QLHF Mggggsggggpepkssdkthtccppcpapellg gpsvflfppkpk dtlmisrtpevtcvvdvshedpevkfnwyvdgve vhnaktkpr eeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkal papiektisk akqprepqvytlppsreemtknqvsltlcvkgfyp sdiavewes ngqpennykttpvldsdsfflyskltvdksrwqqg nvfscsvm healhnhytqkslsispk
10	Cyno-Notch1 NRR amino acid sequence	GGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSL QCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQ CWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAE GQCNP LYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECE WDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLR NSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFP YYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPEALLGQVKA SLLPGGGGGGRRRRELDPM DVRSIVYLEIDN RQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSLNI PYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFM
11	Cyno-Notch1 NRR-Fc nucleotide sequence (nucleotides in lower case type represent the signal sequence and hlgG1 Fc fragment of purified protein)	atgggatggagctgtatcatcctcttctgttagcaacagctacag gcgcgcactccGGTGGGGCCGGGCGCGACATCC CCCC GCCGCTGATCGAGGAGGCGTGCGAGC TGCCCCGAGTGCCAGGAGGACGCGGGCAACA AGGTCTGCAGCCTGCAGTGCAACAACACG CGTGCGGCTGGGACGGCGGTGACTGCTCCC TCAACTTCAATGACCCCTGGAAGAACTGCAC GCAGTCTCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGT GACGGCCACTGTGACAGCCAGTGCAACTCA GCCGGCTGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGC CAGCGTGCGGAAGGCCAGTGCAACCCCTG TACGACCAGTACTGCAAGGACCACTTCAGCG ACGGGCACTGCGACCAGGGCTGCAACAGCG CGGAGTGCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTG CGGAGCATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCG GCACGCTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGC CGGAGCAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTT CCTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACAC CAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGG CCAGCAGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGC GAGGAGGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAG CGTGCCGCCGAGGGCTGGGCCGCACCTGAA GCCCTGCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTG CTCCCTGGTGGCGGTGGAGGTGGGCGGCG GCGGAGGGAGCTGGACCCCATGGACGTCCG CGGCTCCATCGTCTACCTGGAGATTGACAAC CGGCAGTGTGTGCAGGCCTCCTCGCAGTGC TTCCAGAGTGCCACCGACGTGGCCGCATT CTGGGAGCGCTCGCTCGCTGGGACGCCTC AACATCCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGA GTGAGACCGTGGAGCCGCCCCGCGGCG CAGCTGCACTTCATGggagggggcgatccggcgga ggcgagagcccaatcttgacaaaactcacacatgcccac cgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagttctctt cccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccct

		gaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctg aggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat gccaagacaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgta ccgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggtgaa tggaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcca gccccatcgagaaaaccatctcaaagccaagggcagccc cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgaggag atgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggct ctatccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggag ccggagaacaactacaagaccacgctcccgctgctgactccg acggctccttctctctatagcaagctcacgtggacaagagca ggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcgtgatgcatgagg ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccg ggtaaa
12	Cyno-Notch1 NRR nucleotide sequence	GGTGGGGCCGGGCGCGACATCCCCCGCC GCTGATCGAGGAGGCGTGCGAGCTGCCCGA GTGCCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCTG CAGCCTGCAGTGCAACAACACGCGTGCGG CTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTT CAATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCAGTCT CTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGC CACTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGC TGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTG CGGAAGGCCAGTGCAACCCCTGTACGACC AGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGC ACTGCGACCAGGGCTGCAACAGCGCGGAGT GCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGGAG CATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCGGCAGC CTGGTGGTGGTGGTGCTGATGCCGCCGGAG CAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTCCTGC GGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACACCAACG TGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGGCCAGC AGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGCGAGGA GGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGC CGCCGAGGGCTGGGCCGCACCTGAAGCCCT GCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCC TGGTGGCGGTGGAGGTGGGCGGCGGCGGA GGGAGCTGGACCCCATGGACGTCCGCGGCT CCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCA GTGTGTGCAGGCCTCCTCGCAGTGCTTCCA GAGTGCCACCGACGTGGCCGCATTCTGGG AGCGCTCGCCTCGCTGGGCAGCCTCAACAT CCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGA GACCGTGGAGCCGCCCCCGCCGGCGCAGC TGCACTTCATG

Example 2

Generation, Cloning and Humanization of Rat Anti-Notch1 Inhibitory Antibodies

5 A. Immunization and Hybridoma Generation

The human and mouse immunogens described in Example 1 were co-injected into Sprague-Dawley rats for the generation of hybridomas. Sprague-Dawley rats were immunized by subcutaneous injections of a mixture containing 20 µg each of human and mouse Notch1 NRR_Avi_His recombinant proteins in Freund's complete adjuvant.

- 10 Immunizations were repeated at 2-week intervals for 12 weeks. Collected sera samples at day 0, 35, 49, and 63 after the 1st injection were tested for circulating anti-Notch1 antibody titer activity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described below.

- When optimal titers were reached, a final dose of the protein mixture was
15 injected intravenously (tail vein) into a rat having optimal antibody titer 4 days before it was to be sacrificed for splenocyte collection. Total splenocytes (2×10^8) from the rat were fused with mouse myeloma cell line P3X63.Ag8.653 (2.5×10^7) using PEG 4000. Fused cells were plated out in 96-well plates (0.2 ml/well) and subjected to HAT selection (RPMI 1640 containing 5×10^{-4} M Hypoxanthine, 1.6×10^{-5} M
20 Thymidine, 4×10^{-4} M Aminopterin, and 20% Heat Inactivated FCS).

- Fourteen days post fusion, hybridoma supernatants were harvested and tested for the presence of rat IgGs that exhibit binding activity to human and/or mouse Notch1 NRR recombinant protein, and full length Notch1 expressed on the surface of U-2 OS cells by ELISA, as described below. Supernatants that showed binding activity to
25 Notch1 targets were further tested for their ability to block Notch1 mediated signaling activity in a reporter gene assay, as described below. Selected Notch1 signaling blocking clones were then subcloned for further analysis.

B. Screening and Selection of Notch1 Specific Antibodies

30 1. Recombinant protein binding ELISA

Supernatants from hybridoma cultures were first screened for binding to recombinant human and mouse immunogens by ELISA. Purified human or mouse Notch1 NRR_Avi_His tag proteins were coated on CoStar hi-bound 96-well ELISA

plates in 100µl of PBS with Mg/Ca at a concentration of 1µg/ml overnight. The plates were washed with PBS-Mg/Ca and blocked for 1 hour with 1% BSA in PBS-Mg/Ca. Blocking solution was decanted from the plate and hybridoma culture supernatants were applied to the plate. After incubation at room temperature for 1 hour, plates were washed again with PBS-Mg/Ca before HRP-conjugated secondary antibody diluted (1:20,000) in blocking buffer was applied. When the primary antibody tested was rat IgG, the secondary antibody was goat anti-rat IgG Fc (Bethyl Biotech); and when the primary antibody was mouse IgG, the secondary antibody was goat anti-mouse IgG Fc (Thermal Scientific).

After 1 hour incubation with the secondary antibody, plates were washed again, as described above, and TMB substrate solution was added. The developing reaction was allowed for 10 minutes before the stopping solution, 0.18M H₂SO₄, was added. Absorbance at O. D. 450 nM was measured and data was plotted and analyzed with Microsoft Excel and Graphpad-Prizm software. The antibodies exhibiting binding activity to human and/or mouse Notch1 NRR were selected for further cell based ELISA, as described below.

2. Cell based ELISA

Supernatants from clones displaying positive binding to immunogens in recombinant Notch1 NRR based ELISAs described above were then screened for cell surface Notch1 binding in a cell-based ELISA. U-2 OS cells stably overexpressing human or mouse full length Notch1 protein on cell surface were plated at 50,000 cells/well in 96 well plates (white opaque, BD/VWR) the day before ELISA assay. On the day of the ELISA, culture media were removed from wells and serially diluted (1:3 in blocking buffer) antibody solutions or hybridoma culture supernatants were applied to the plate. Plates were incubated at room temperature for 2 hours before being washed with PBS-Mg/Ca. HRP-conjugated secondary antibody was then applied and incubated with cells for 1 hour as described above for recombinant protein ELISA. Plates were washed with PBS-Mg/Ca before being developed with Pico-Chemiluminescent developing kit (Thermal Scientific), and chemiluminescence measurements were performed per manufacturer's instructions. Data plotting and analyses were performed with Microsoft Excel and Graphpad-Prizm software. This data was used in screening of hybridoma clones and the characterization of a parental rat and humanized antibodies, as described in the Examples below.

3. Reporter gene assays

Supernatants from clones displaying positive binding to immunogens were then screened for neutralization activity in human and mouse Notch1 reporter gene co-culture assays (RGA). Results of the screening were used to select primary clones.

Human Notch1 reporter cells were trypsinized and harvested from culture plate in complete McCoy's 5A media (McCoy's 5A with 10% FBS and penicillin, streptomycin, Invitrogen) and counted. Appropriate dilutions of cells were made with the same medium to allow for 3,000 cells/well in a total volume of 80µl/well on a 96 well culture plate (white opaque, BD/VWR), in the presence of serially diluted (1:3 in complete McCoy's 5A media) antibody solutions or hybridoma culture supernatants. The mixture of cells and antibody dilutions were incubated on the plates in a cell culture incubator (37°C, 5% CO₂) for 1hr before 15,000/well of human DLL4-HEK293 cells were added to each well. After addition of hDLL4-HEK293 cells, the plates were further incubated for 20hrs in the incubator and Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) was used to measure the firefly luciferase and internal control *Renilla* luciferase activity per manufacturer's instructions. Data was plotted and analyzed using Microsoft Excel and Graphpad-Prism software. Mouse Notch1 reporter gene co-culture assay was performed as described for human Notch1 reporter gene co-culture assay, except 20,000 cells/well of mouse Notch1 reporter cells were co-cultured with 40,000 cells/well of mouse DLL4-HEK293 cells.

C. Cloning and Sequencing

Primary clones with confirmed cell surface binding or neutralizing activities were subcloned, such as clones 438 and 351 further described below. RNAs from the subclones were extracted and the variable region DNA sequences from the expressed antibodies were obtained via RT-PCR cloning, as described below.

One to five million of the subcloned hybridoma cells were homogenized for total RNA isolation with QIAGEN RNeasy Mini kit. First strand cDNA was then produced using SuperScript III RT kit (Invitrogen). Double stranded cDNAs for variable regions of anti-Notch1 IgGs were subsequently generated and amplified by PCR using primers from the rat IgG heavy chain (IgG1, 2a, 2b) and light chain (kappa or lamda) constant regions, as described below. PCR cycling conditions: 1 cycle at 95°C for 1 min; 25 cycles at 95°C for 1 min, 63°C for 1 min and 72 °C for 1 min. The resulting RT-PCR

products were cloned into TOPO-Blunt cloning vector (Invitrogen) and sequenced by conventional methods.

Variable (V) region cDNAs from parental rat 438 and parental rat 351 (hereinafter “rat 438” and “rat 351”, respectively) were subcloned into mammalian expression vectors wherein rat Variable Heavy chain (VH) were fused in frame with murine IgG1 (mIgG1), and rat Variable Light chain (VL) were fused with murine kappa. Similarly, for the generation of chimeric antibodies with rat V region and human IgG constant region, rat VH was fused in frame with human IgG1 (hIgG1), and VL with human kappa, respectively. Corresponding chimeric antibodies were generated from these constructs by transient transfection in COS cells and their binding and neutralizing activities were confirmed in assays.

Purified rat variable-mouse constant chimeric antibodies (hereinafter “rat 438-mIgG1” and “rat 351-mIgG1”) were further characterized in a series of *in vitro* and *in vivo* assays, including recombinant antigen and cell surface target binding, inhibition of Notch1 activity in the RGA and angiogenesis assays, and tumor growth inhibition in mouse models, as described in the Examples below. The lead antibodies, rat 438 and rat 351 were selected based on these studies. **Table 2** lists the amino acid and nucleic acid sequences of various regions of rat 438 and rat 351’s variable regions and additional clones 90, 132, 132 (A12/G11) and 137.

20

Table 2: Rat variable region sequences

SEQ ID NO:		
13	438 Heavy Chain Variable Region amino acid sequence	AVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCITASGFTFS SFAMAWVRQAPTKGLEWVASISYGGADTY YRDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMDSLRSE DTSTYYCAKDLPPYYGYTPFVMDAWGQGT STVSS
14	438 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence	GCGGTACAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCTTGAAA CTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTAGCTTTGCAATGGCCTGGGTCCGC CAGGCTCCAACGAAGGGGCTGGAGTGGG TCGCATCCATTAGTTATGGTGGTGTGAC ACTTACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCC GATTCATATCTCCAGAGATAATGCAAAA AGCAGCCTATATTTGCAAATGGACAGTCT GAGGTCTGAGGACACGTCCACTTATTACT GTGCAAAAGACCTTCCATACTACGGATAT ACCCCCTTTGTTATGGATGCCTGGGGTCA GGGAAGTTCAGTCACTGTCTCCTCA

15	438 Heavy Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence Kabat	SFAMA
16	438 Heavy Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence Chothia	GFTFSSFAMA
17	438 Heavy Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence Kabat	TCCTTCGCCATGGCC
18	438 Heavy Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence Chothia	GGATTCACCTTTAGTTCCTTCGCCATGGC C
19	438 Heavy Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence Kabat	SISYGGADTYRDSVKG
20	438 Heavy Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence Chothia	SYGGAD
21	438 Heavy Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence Kabat	TCCATCTCCTATGGAGGCGCTGACACCTA CTACCGGGACTCCGTGAAGGGC
22	438 Heavy Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence Chothia	CCTATGGAGGCGCTGAC
23	438 Heavy Chain Variable Region CDR3 amino acid sequence Kabat and Chothia	DLPYYGYTPFVMDA
24	438 Heavy Chain Variable Region CDR3 nucleotide sequence Kabat and Chotia	GATCTGCCCTACTACGGCTACACCCCTT CGTGATGGACGCC
25	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence	DIMLTQSPPTLSVTPGETISLSCRASQRINT DLHWYQQKPNESPRVLIKFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYCQQS NSWPYTFGAGTKLELK
26	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCACCTAC CCTGTCTGTA ACTCCAGGAGAGACCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGAATT AACACTGACTTACATTGGTATCAGCAAAA ACCAAATGAGTCTCCAAGGGTTCTCATCA AATTTGCTTCCCAGACCATCTCTGGAGTC CCCTCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGA GTAGAGCCTGAAGATTTTTCAGTTTATTAC TGTC AACAGAGTAATAGCTGGCCATACAC GTTTGGCGCTGGGACCAAGCTGGA ACTG AAA
27	438 Light Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence Kabat and Chothia	RASQRINTDLH
28	438 Light Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence Kabat and Chothia	CGGGCCTCCCAGCGGATCAACACCGACC TGCAC

29	438 Light Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence Kabat and Chothia	FASQTIS
30	438 Light Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence Kabat and Chothia	TTCGCCAGCCAGACCATCTCC
31	438 Light Chain Variable Region CDR3 amino acid sequence Kabat and Chothia	QQSNSWPYT
32	438 Light Chain Variable Region CDR3 nucleotide sequence Kabat and Chothia	CAGCAGTCCAACCTCCTGGCCCTACACC
33	351 Heavy Chain Variable Region amino acid sequence	EVQLVESGGGLVQPGRSLKVSCLASGFTFS HYGMNWIRQAPGKGLDWVASISRSGSYIR YVDTVKG RFTVSRDIAKNTLYLQMTSLRSE DTALYYCAREGQFGDYFEYWGQGMVTV SS
34	351 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAA AGTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTCACTATGGAATGAACTGGATTGCGC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGGT TGCATCTATTAGTAGGAGTGGCAGTTACA TCCGCTATGTAGACACAGTGAAGGGCCG ATTCACCGTCTCCAGAGACATTGCCAAGA ACACCCTGTACCTGCAAAATGACCAGTCTG AGGTCTGAAGACACTGCCTTGTTACTG TGCAAGAGAGGGACAATTCGGGGACTAC TTTGAGTACTGGGGCCAAGGAGTCATGG TCACAGTCTCCTCA
35	351 Heavy Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence Kabat	HYGMN
36	351 Heavy Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence Chothia	GFTFSHYGMN
37	351 Heavy Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence Kabat	CACTATGGAATGAAC
38	351 Heavy Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence Chothia	GGATTCACCTTCAGTCACTATGGAATGAA C
39	351 Heavy Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence Kabat	SISRSGSYIRYVDTVKG
40	351 Heavy Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence Chothia	SRSGSY
41	351 Heavy Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence Kabat	TCTATTAGTAGGAGTGGCAGTTACATCCG CTATGTAGACACAGTGAAGGGC
42	351 Heavy Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence Chothia	AGTAGGAGTGGCAGTTAC

43	351 Heavy Chain Variable Region CDR3 amino acid sequence Kabat and Chothia	EGQFGDYFEY
44	351 Heavy Chain Variable Region CDR3 nucleotide sequence Kabat and Chothia	GAGGGACAATTCGGGGACTACTTTGAGTA C
45	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence	DIMLTQSPATLSVTPGERISLSCRASQKIST NLHWYQQKPNESPRILIKYASQTISGIPSRF SGSGSGTDFTLHINTVEPEDFSVYYCQQTN SWPLTFGSGTKLEIK
46	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTAC CCTGTCTGTAAGTCCAGGAGAGAGAATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAAAATT AGCACTAACTTACATTGGTATCAGCAAAA GCCAAATGAGTCTCCAAGGATTCTCATCA AATATGCTTCCCAGACCATCTCTGGAATC CCCTCCAGGTTTCACTGTCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCTCCATATTACACA GTAGAGCCTGAAGATTTTTCAGTTTATTAC TGTCAACAGACTAATAGTTGGCCGCTCAC GTTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATC AAG
47	351 Light Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence Kabat and Chothia	RASQKISTNLH
48	351 Light Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence Kabat and Chothia	AGGGCCAGTCAGAAAATTAGCACTAACTT ACAT
49	351 Light Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence Kabat and Chothia	YASQTIS
50	351 Light Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence Kabat and Chothia	TATGCTTCCCAGACCATCTCT
51	351 Light Chain Variable Region CDR3 amino acid sequence Kabat and Chothia	QQTNSWPLT
52	351 Light Chain Variable Region CDR3 nucleotide sequence Kabat and Chothia	CAACAGACTAATAGTTGGCCGCTCACG
53	90 Heavy Chain Variable Region amino acid sequence (kabat CDR underlined)	<u>EVQLVESGGGLVQPGRSLLKSLASGFTFS</u> <u>HYGVNWIRQAPGKGLEWIASISRSSSYIYYA</u> <u>DTVKGRTISRDNKNTLFLQLTSLRSEDTA</u> <u>LYYCAREGQFGDYFEYWGRGVMVTSS</u>
54	90 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence	GAGGTGCAGCTAGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAA ACTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTCACTATGGAGTGAAGTGGATTGCGC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGAT TGCATCTATTAGTAGAAGTAGCAGTTACA TCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGA ACACCCTGTTCTGCAATTGACCAGTCTG AGGTCTGAAGACACTGCCTTGATTACTG

		TGCAAGAGAGGGGCAATTCGGGGACTAC TTTGAATACTGGGGCCGAGGAGTCATGG TCACAGTCTCCTCA
55	90 Light Chain Variable Region amino acid sequence (kabat CDR underlined)	DIILTQSPAALSVTPGESISLSCRASQSINTN <u>LHWYQQKPNESPRVLIKYASQTISGIPSRFS</u> SGSGGTDFTLNINRVEPEDFSVYYC <u>QQSNS</u> <u>WPLTFGSGTKLEIK</u>
56	90 Light Chain Variable Region nucleotide sequence	GACATCATACTGACTCAGTCTCCAGCTGC CCTGTCTGTAAGTCCAGGAGAGAGCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATT AACACTAACTTGCATTGGTATCAGCAAAA ACCAAATGAGTCTCCAAGGGTTCTCATCA AATATGCTTCCCAGACCATCTCTGGAATC CCCTCCAGGTTTCACTGTCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGA GTAGAGCCTGAAGATTTTTCAGTTTATTAC TGTC AACAGAGTAATAGCTGGCCGCTCAC GTTCTGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATC AAA
57	132 Heavy Chain Variable Region amino acid sequence (kabat CDR underlined)	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFS <u>HYGMNWIRQAPGKGLEWITSITSSSYIYYA</u> <u>DTVKG</u> RFTISRDNANTLYLQMTSLRSED TALYYCAREGQFGDYFDYWGQGMVTVSS
58	132 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAA ACTCTCCTGTTAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTCACTATGGAATGAACTGGATTCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAT TACATCTATTACTAGTAGTAGCAGTTACAT CTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA CACCTGTACCTGCAAATGACCAGTCTGA GGTCTGAAGACACTGCCTTGATTACTGT GCAAGAGAGGGGCAATTCGGGGACTACT TTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTC ACAGTCTCCTCA
59	132 Light Chain Variable Region amino acid sequence (kabat CDR underlined)	DIMLTQSPATLSVTPGESISLSCRASQSINT <u>NLHWYQQKPNESPRVLIKYASQTISGIPSRF</u> <u>SGSGGTDFTLNINRVEPEDFSVYYCQQSN</u> <u>SWPLTFGSGTKLEIK</u>
60	132 Light Chain Variable Region nucleotide sequence	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTAC CCTGTCTGTAAGTCCAGGAGAGAGCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATT AACACTAACTTACATTGGTATCAGCAAAA CCAAATGAGTCTCCAAGGGTTCTCATCAA ATATGCTTCCCAGACCATCTCTGGAATCC CCTCCAGGTTTCACTGTCAGTGGATCAGG GACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGAGT AGAGCCTGAAGATTTTTCAGTTTATTACTG TCAACAGAGTAATAGCTGGCCGCTCACGT TCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAA A

61	132_A12 Heavy Chain Variable Region amino acid sequence (kabat CDR underlined)	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFS <u>HYGMNWIRQAPGKGLEWITSITSSSSYIYYA</u> <u>DTVKGRFTISRDNANTLYLQMTSLRSED</u> <u>ALYYCAREGQFGDYFDYWGQGMVTVSS</u>
62	132_A12 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAA ACTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTCACTATGGAATGAACTGGATTGCGC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAT TACATCTATTACTAGTAGTAGCAGTTACAT CTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA CACCTGTACCTGCAAATGACCAGTCTGA GGTCTGAAGACACTGCCTTGTATTACTGT GCAAGAGAGGGGCAATTCGGGGACTACT TTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTC ACAGTCTCCTCA
63	132_G11 Light Chain Variable Region amino acid sequence (kabat CDR underlined)	DIMLTQSPATLSVTPGESISLSCRASQSINT <u>NLHWYQQKPNESPRVLIKYASQTISGIPSRF</u> <u>SGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYCQQSN</u> <u>SWPLTFGSGTKLEIK</u>
64	132_G11 Light Chain Variable Region nucleotide sequence	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTAC CCTGTCTGTAACCTCCAGGAGAGAGCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATT AACACTAACTTACATTGGTATCAGCAAAAA CCAAATGAGTCTCCAAGGGTTCTCATCAA ATATGCTTCCCAGACCATCTCTGGAATCC CCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGG GACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGAGT AGAGCCTGAAGATTTTTAGTTTATTACTG TCAACAGAGTAATAGCTGGCCGCTCACGT TCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAA A
65	137 Heavy Chain Variable Region amino acid sequence (kabat CDR underlined)	QVQVKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLT <u>SYHVSWVRQPPGKGLEWMGAIWTGGSTA</u> <u>YNSLLKSRLSISRDISKSQVFLKMNSLQTED</u> <u>TATYYCARADFYVMDAWGQGASVTVSS</u>
66	137 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence	CAGGTGCAGGTGAAGGAGTCAGGACCTG GTCTGGTGCAGCCCTCACAGACTTTGTCT CTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACT AACCAGCTATCATGTAAGCTGGGTTGCGC AGCCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGAT GGGAGCAATATGGAAGTGGTGGAAAGCACA GCATATAATTCACTTCTCAAATCCCGACT GAGCATCAGCAGGGACATCTCCAAGAGC CAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAA ACTGAAGACACAGCCACTTACTACTGTGC CAGAGCCGATTTCTATGTTATGGATGCCT GGGGTCAAGGAGCTTCAGTCACTGTCTC CTCA

67	137 Light Chain Variable Region amino acid sequence (kabat CDR underlined)	DIMLTQSPVTLVSPGESISLSCRASQSIST <u>DLHWYQQKPNESPRVLIKYGSQTISGIPSRF</u> <u>SGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYCQQSN</u> <u>SWPWTFGGGTKLELK</u>
68	137 Light Chain Variable Region nucleotide sequence	ACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGTTACC CTGTCTGTGTCTCCAGGAGAGAGCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATT AGCACTGACTTGCATTGGTATCAGCAAAA ACCAAATGAGTCTCCAAGGGTTCTCATCA AATATGGTCCCAGACCATCTCTGGAATC CCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGA GTAGAGCCTGAAGATTTTTCAGTTTATTAC TGTCAGCAGAGTAATAGCTGGCCATGGA CATTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATT GAAA

D. Humanization of rat 438 and rat 351

Rat 438 and rat 351 were humanized and further developed to provide
5 humanized monoclonal antibodies 438 and 351 (hereinafter “humanized 438” and
“humanized 351”, respectively). A human IgG1 heavy chain constant region with 3
mutations in the lower hinge region (L234A/L235A/G237A), that inactivate hlgG1's
effector functions, and a human kappa light chain constant region were used as the
constant region for the humanized 438 and humanized 351 antibodies. Humanization
10 of rat 438 and rat 351 variable regions was performed using CDR graft strategy.

Table 3 provides the amino acid and nucleic acid sequences of various regions
of humanized 438 and humanized 351 variants. The lead humanized 438 variant was
determined to be VH1.1/VL1.8 after testing. Humanized 438 VH1.1/VL1.8 has a
variable heavy chain as set forth in SEQ ID NO: 71 and a variable light chain as set
15 forth in SEQ ID NO: 97. For humanized 438 variants, the CDR regions for variants VH
1.0 and 1.1 are the same and the CDR regions for variants VL 1.0, 1.1, 1.3, 1.4, 1.5,
1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 1.10 and 1.11 are the same. The lead humanized 351 variant was
determined to be VH1.0/VL1.1 after testing. Humanized 351 VH1.0/VL1.1 has a
variable heavy chain as set forth in SEQ ID NO: 115 and a variable light chain as set
20 forth in SEQ ID NO: 129. For humanized 351 variants, the CDR regions for variants VL
1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, and 1.7 are the same.

Table 3: Humanized 438 and humanized 351 sequences

SEQ ID NO:		
69	438 Heavy Chain Variable Region amino acid (VH1.0)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADT YYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLPYYGYTPFVMDAWGQGT LTVSS
70	438 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence (VH1.0)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCTATGGAGGCGCT GACACCTACTACCGGGACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCGAGAGATCTGCCCTACTACG GCTACACCCCTTCGTGATGGACGCCTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
71	438 Heavy Chain Variable Region amino acid sequence (VH 1.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADT YYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDLPPYYGYTPFVMDAWGQGT LTVSS
72	438 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence (VH1.1)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCTATGGAGGCGCT GACACCTACTACCGGGACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCGAAGGATCTGCCCTACTACG GCTACACCCCTTCGTGATGGACGCCTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
73	438 Heavy Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence (VH1.1) Kabat	SFAMA
74	438 Heavy Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence (VH1.1) Chothia	GFTFSSFAMA
75	438 Heavy Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence (VH1.1) Kabat	TCCTTCGCCATGGCC
76	438 Heavy Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence (VH1.1) Chothia	GGATTCACCTTTAGTTCCTTCGCCATGGC C

77	438 Heavy Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence (VH1.1) Kabat	SISYGGADTYRDSVKG
78	438 Heavy Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence (VH1.1) Chothia	SYGGAD
79	438 Heavy Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence (VH1.1) Kabat	TCCATCTCCTATGGAGGCGCTGACACCTA CTACCGGGACTCCGTGAAGGGC
80	438 Heavy Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence (VH1.1) Chothia	CCTATGGAGGCGCTGAC
81	438 Heavy Chain Variable Region CDR3 amino acid sequence (VH1.1) Kabat and Chothia	DLPYYGYTPFVMDA
82	438 Heavy Chain Variable Region CDR3 nucleotide sequence (VH1.1) Kabat and Chotia	GATCTGCCCTACTACGGCTACACCCCTT CGTGATGGACGCC
83	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.0)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKLLIYFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
84	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.0)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTCGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
85	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.1)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKVLIFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
86	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.1)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTGCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAGCAGTCCAACCTCCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA
87	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.3)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKLLIYFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK

88	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.3)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACTCCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
89	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKVLIIYFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
90	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.4)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTGCTGA TCTATTTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACTCCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
91	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKLLIKFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
92	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.5)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACTCCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
93	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.6)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKVLIIYFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
94	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.6)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA

		CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGGTGCTGA TCTATTTGCGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
95	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.7)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKLLIKFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGKLEIK
96	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.7)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGAT CAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
97	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.8)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKVLIFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGKLEIK
98	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.8)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGGTGCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAGCAGTCCAACCTCCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA
99	438 Light Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence (VL1.8) Kabat and Chothia	RASQRINTDLH
100	438 Light Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence (VL1.8) Kabat and Chothia	CGGGCCTCCCAGCGGATCAACACCGACC TGCAC
101	438 Light Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence (VL1.8) Kabat and Chothia	FASQTIS
102	438 Light Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence (VL1.8) Kabat and Chothia	TTCGCCAGCCAGACCATCTCC

103	438 Light Chain Variable Region CDR3 amino acid sequence (VL1.8) Kabat and Chothia	QQSNSWPYT
104	438 Light Chain Variable Region CDR3 nucleotide sequence (VL1.8) Kabat and Chothia	CAGCAGTCCAACTCCTGGCCCTACACC
105	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.9)	DIMLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKVLIFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
106	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.9)	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTGCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAGCAGTCCAACTCCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA
107	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.10)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRINT DLHWYQQKPGKAPRVLIKFAQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
108	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.10)	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAGGGTGCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAGCAGTCCAACTCCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA
109	438 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRINT DLHWYQQKPGKAPRVLIKFAQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
110	438 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.11)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAGGGTGCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAGCAGTCCAACTCCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA

111	438 Heavy Chain amino acid sequence (VH1.1)-hlgG1-3M (CDRs underlined)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADT <u>YYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA</u> EDTAVYYCAK <u>DLPYYGYTPFVMDAWGQGT</u> LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
112	438 Heavy Chain nucleotide sequence (VH1.1)-hlgG1-3M	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCTATGGAGGCGCT GACACCTACTACCGGGACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCGAAGGATCTGCCCTACTACG GCTACACCCCTTCGTGATGGACGCCTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCC TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGC TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT GTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCCGCTGGGGCACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGA

		ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCG GGTAAA
113	438 Light Chain amino acid sequence (VL1.8)-hkappa (CDRs underlined)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT <u>DLHWYQQKPGKAPKVLIKFASQTISGVPSR</u> <u>FSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQS</u> <u>NSWPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD</u> EQLKSGTASVCLLNFPYFPAKRVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT SKADYEHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
114	438 Light Chain nucleotide sequence (VL1.8)-hkappa	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCCTAGGGTGCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCT ACTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACG CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGT
115	351 Heavy Chain Variable Region amino acid (VH1.0)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SHYGMNWVRQAPGKLEWVASISRSGSYI RYVDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREGQFGDYFEYWGGTGLTV SS
116	351 Heavy Chain Variable Region nucleotide sequence (VH1.0)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCC TTAGTCACTACGGCATGAACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCAGATCCGGCTCC TACATCAGATACGTGGACACCGTGAAGG

		GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TTACTGTGCGAGAGAGGGCCAGTTCGGC GACTACTTCGAGTACTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA
117	351 Heavy Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence (VH1.0) Kabat	HYGMN
118	351 Heavy Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence (VH1.0) Chothia	GFTFSHYGMN
119	351 Heavy Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence (VH1.0) Kabat	CACTATGGAATGAAC
120	351 Heavy Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence (VH1.0) Chothia	GGATTCACCTTTCAGTCACTATGGAATGAA C
121	351 Heavy Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence (VH1.0) Kabat	SISRSGSYIRYVDTVKG
122	351 Heavy Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence (VH1.0) Chothia	SRSGSY
123	351 Heavy Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence (VH1.0) Kabat	TCTATTAGTAGGAGTGGCAGTTACATCCG CTATGTAGACACAGTGAAGGGC
124	351 Heavy Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence (VH 1.0) Chothia	AGTAGGAGTGGCAGTTAC
125	351 Heavy Chain Variable Region CDR3 amino acid sequence (VH 1.0) Kabat and Chothia	EGQFGDYFEY
126	351 Heavy Chain Variable Region CDR3 nucleotide sequence (VH 1.0) Kabat and Chotia	GAGGGACAATTCGGGGACTACTTTGAGTA C
127	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.0)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
128	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.0)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTA CTGTGAGCAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA

129	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
130	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.1)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGATCCTGATC AAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTGAGCAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
131	351 Light Chain Variable Region CDR1 amino acid sequence (VL1.1) Kabat and Chothia	RASQKISTNLH
132	351 Light Chain Variable Region CDR1 nucleotide sequence (VL1.1) Kabat and Chothia	AGGGCCAGTCAGAAAATTAGCACTAACTT ACAT
133	351 Light Chain Variable Region CDR2 amino acid sequence (VL1.1) Kabat and Chothia	YASQTIS
134	351 Light Chain Variable Region CDR2 nucleotide sequence (VL1.1) Kabat and Chothia	TATGCTTCCCAGACCATCTCT
135	351 Light Chain Variable Region CDR3 amino acid sequence (VL1.1) Kabat and Chothia	QQTNSWPLTT
136	351 Light Chain Variable Region CDR3 nucleotide sequence (VL1.1) Kabat and Chothia	CAACAGACTAATAGTTGGCCGCTCAGG
137	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.2)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
138	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.2)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTGAGCAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
139	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKILIIYYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQT

		SWPLTFGGGTKVEIK
140	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.3)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGATCCTGATC TATTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGGT CCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTCAGCAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
141	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKLLIKYASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
142	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.4)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CAAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGACCAACTCCTGGCCC CTGACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG AGATCAAA
143	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.5)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKILIIYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
144	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.5)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGATCCTGATC TATTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGGT CCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTCAGCAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
145	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.6)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKLLIKYASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
146	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.6)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT

		CAAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGACCAACTCCTGGCCC CTGACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG AGATCAAA
147	351 Light Chain Variable Region amino acid sequence (VL1.7)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTN SWPLTFGGGTKVEIK
148	351 Light Chain Variable Region nucleotide sequence (VL1.7)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCTCCAGAAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAAGCCCCTAAGATCCTGATC AAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTCAGCAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
149	351 Heavy Chain amino acid sequence (VH1.0)-hlgG1-3M (CDRs underlined)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>SHYGMN</u> WVRQAPGKGLEWVASISRS <u>GSYI</u> <u>RYVD</u> TVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARE <u>GGQFGDYFEY</u> WGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
150	351 Heavy Chain nucleotide sequence (VH1.0)-hlgG1-3M	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTAGTCACTACGGCATGAACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCAGATCCGGCTCC TACATCAGATACGTGGACACCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCGAGAGAGGGCCAGTTCGGC GACTACTTCGAGTACTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA

151	351 Light Chain amino acid sequence (VL1.1)-hkappa (CDRs underlined)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC <u>RASQKIST</u> <u>NLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGVPSRF</u> <u>SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTN</u> <u>SWPLT</u> FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
152	351 Light Chain nucleotide sequence (VL1.1)-hkappa	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGAAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCCTAAGATCCTGATC AAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCACTTACTA CTGTCAGCAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA

cDNAs containing human acceptor framework, DP54 for heavy chain and DPK9 for light chain, with relevant CDR donor sequences were synthesized by GeneArt, AG. Synthesized cDNA products were subcloned and fused in frame with human IgG1-3m constant region for the heavy chain, or human kappa for the light chain in mammalian expression vectors pSMED2 and pSMN2, respectively. Alignment of the VHs and VLs of human acceptor framework, rat 438 and humanized 438 variants, along with rat 351 and humanized 351 variants are shown in **Table 4** below. The CDRs of Kabat scheme are underlined. For 351VH and 351VL, the lower case text in framework region indicates the difference in residues between rat 351 and humanized 351 variants.

There is significant homology between human acceptor framework and that of rat 438 variable region, 78% for VH and 61% for VL. Also, there is significant homology between human acceptor framework and rat 351 variable regions, 76% for VH and 61% for VL.

Table 4: Alignment of human acceptor framework, rat 438 and humanized 438 variants, along with rat 351 and humanized 351 variants. (CDRs of Kabat scheme are underlined)

438VH:			
DP54_JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSYWM	SVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY 80
Rat438VH	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CTASGFTFSSFAMAWVRQAP	TGKLEWVASISYGGADTYRDSVKGRFTISRDNAKNSLY 80
438VH1.0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSFAMAWVRQAP	GKLEWVASISYGGADTYRDSVKGRFTISRDNAKNSLY 80
438VH1.1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSFAMAWVRQAP	GKLEWVASISYGGADTYRDSVKGRFTISRDNAKNSLY 80

DP54_JH4	LQMNSLRAEDTAVYYCAR---YFDY-----WGQGLTVTVSS	113
Rat438VH	LQMDSLRS EDTSTYYCAKDLFPYYGYTPFVMDAWGQGSTVTVSS	123
438VH1.0	LQMNSLRAEDTAVYYCARDLFPYYGYTPFVMDAWGQGLTVTVSS	123
438VH1.1	LQMNSLRAEDTAVYYCAKDLFPYYGYTPFVMDAWGQGLTVTVSS	123
438VL:		
DPK9_Jk2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP	80
Rat438VL	DIMLTQSPPTLSVTPGETISLSCRASQRINTDLHWYQQKPNESPRVLIKFASQTISGVPSRFRSGSGSGTDFTLNINRVEP	80
438VL1.0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRINTDLHWYQQKPGKAPKLLIYFASQTISGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP	80
438VL1.8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRINTDLHWYQQKPGKAPKVLIKFASQTISGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP	80
DPK9_Jk2	EDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK	107
Rat438VL	EDFSVYYCQQSNSWPFYTFGAGTKLELK	107
438VL1.0	EDFATYYCQQSNSWPFYTFGQGTKLEIK	107
438VL1.8	EDFATYYCQQSNSWPFYTFGQGTKLEIK	107
351VH:		
DP54_JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLrLSCaASGFTFS <u>SYWMS</u> WVRQAPGKGLDWVA <u>NIKQDGSEKYYVDSVKGR</u> RFTiSRDnAKNsLY	80
Rat351VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLKVSCLASGFTFS <u>HYGMN</u> WIRQAPGKGLDWVA <u>SISRSGSYIRYVDTVKGR</u> RFTVSRDIAKNTLY	80
351VH1.0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLScaASGFTFS <u>HYGMN</u> WVRQAPGKGLDWVA <u>SISRSGSYIRYVDTVKGR</u> RFTISRDNAKNSLY	80
DP54_JH4	LQMnSLRaEDTAvYYCAR-----YFDYWGQGLTVTVSS	113
Rat351VH	LQMTSLRSED TALYYCAR <u>EGQFGDYFEY</u> WGQGMVTVSS	119
351VH1.0	LQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>EGQFGDYFEY</u> WGQGLTVTVSS	119
351VL:		
DPK9_Jk4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGkaPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISslQP	80
Rat351VL	DIMLTQSPATLSVTPGERISLSC <u>RASQKISTNLH</u> WYQQKPNESPRILIK <u>YASQTIS</u> GIPSRFRSGSGSGTDFTLHINTVEP	80
351VL1.0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKISTNLHWYQQKPGKAPKLLIY <u>YASQTIS</u> GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP	80
351VL1.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKISTNLHWYQQKPGKAPKILIK <u>YASQTIS</u> GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP	80
DPK9_Jk4	EDFatYYC <u>QQSYSTPLT</u> FGGGTKvEIK	107
Rat351VL	EDFSVYYC <u>QQTNSWPLT</u> FGSGTKLEIK	107
351VL1.0	EDFATYYC <u>QQTNSWPLT</u> FGGGTKVEIK	107
351VL1.1	EDFATYYC <u>QQTNSWPLT</u> FGGGTKVEIK	107

During humanization, CDR grafted antibodies may result in a loss of activity of the original antibody. Differences in the framework region may account for the altered conformation of the resulting humanized 438 and humanized 351 antibodies, and

5 selected back mutations in the human acceptor framework to that of original antibody were introduced to recover the activity and binding epitope. **Table 5** shows selected

back mutations in the human acceptor framework to rat 438 and rat 351 residues at the corresponding positions to optimize the activity and binding epitope.

Table 5: Back mutations in VH and VL of humanized 438 and humanized 351 variants.

438 VH Variant	1.0	1.1							
VH back mutation	none	R94K							
438 VL Variant	1.0	1.1	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
VL back mutation	none	M4L L46V Y49K	M4L	L46V	Y49K	M4L L46V	M4L Y49K	L46V Y49K	Q3M M4L L46V Y49K
351 VH Variant	1.0								
VH back mutation	none								
351 VL Variant	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	
VL back mutation	none	L46V Y49K	M4L	L46I	Y49K	M4L L46I	M4L Y49K	M4L L46V Y49K	

5

Example 3

Characterization of Anti-Notch1 Inhibitory Antibodies

10

A. Expression and Binding to Notch1

Relative expression yields of humanized 438 and humanized 351 variants were tested in a transient expression assay in COS cells. As shown in **Table 6**, a number of humanized 438 variants, including humanized 438 VH1.1/VL1.8, and a number of humanized 351 variants, including humanized 351 VH1.0/VL1.1, demonstrated significant yields of more than 30µg/ml.

15

Table 6. Relative expression yields in conditioned media of humanized 438 variants and humanized 351 variants in transient expression in COS cells.

438 Variant	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 Yield (µg/ml)	41.51	41.63	85.73	35.11	36.94	40.08	51.9	62.58

438 Variant	VH1.0/VL1.1	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 Yield (µg/ml)	45.86	23.2	49.47	65.93	47.72	31.95	66.65	14.12
438 Variant	VH1.1/VL1.10	VH1.1/VL1.11						
438 Yield (µg/ml)	36.7	37.54						
351 Variant	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 Yield (µg/ml)	33.5	26.66	24.52	25.1	35.20	29.25	28.93	33.54

Total expression levels of IgGs in conditioned media were measured by quantitative IgG ELISA, as described in Example 2. **Table 7** shows EC₅₀ (nM) values calculated from cell surface Notch1 binding ELISAs for humanized 438 variants and rat 438, along with humanized 351 variants and rat 351.

The data demonstrates that multiple variants of humanized 438, including humanized 438 VH1.1/VL1.8, are similar to rat 438 in binding to full-length human Notch1 expressed on the cell surface of U-2 OS cells. Furthermore, **Table 7** shows that both humanized 438 VH1.1/VL1.8 and VH1.1/VL1.3 fully retained rat 438's cross-reactivity to mouse Notch1 expressed on the cell surface of U-2 OS cells.

The data further demonstrates that humanized 351 VH1.0/VL1.1 and VH1.1/VL1.4, are similar to rat 351 in binding to full-length human Notch1 expressed on the cell surface of U-2 OS cells. **Table 7** further shows that humanized 351 VH1.0/VL1.1 and VH1.1/VL1.4 fully retained rat 351's cross-reactivity to mouse Notch1 expressed on the cell surface of U-2 OS cells.

Table 7. EC₅₀ (nM) values of cell surface Notch1 binding ELISAs for humanized 438 variants and rat 438, along with humanized 351 variants and rat 351.

EC ₅₀ (nM)								
Antibody	Rat 438	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
Human Notch1	0.2132	0.305	0.2956	0.1773	0.1516	0.2189	0.2025	0.1776
Mouse Notch1	0.1725	0.2287	0.1437	0.1291	0.09337	0.1457	0.1489	0.1374
EC ₅₀ (nM)								
Antibody	Rat 351	VH1.0/VL1.1	VH1.0/VL1.4					
Human Notch1	0.10	0.15	0.10					
Mouse Notch1	0.07	0.08	0.07					

B. Competition ELISA

5 Competition ELISAs between humanized 438 variants and biotinylated rat 438, along with humanized 351 variants and biotinylated rat 351, on recombinant or cell surface expressed full length human Notch1 was performed. In a similar manner as described for recombinant protein or cell based ELISAs, 96 well cell culture plates were either coated with Notch1 NRR-Avi_His protein (hi-bound co-Star
10 plates), or seeded with full length Notch1 expressing U-2 OS cells (cell culture plate, Co-star), respectively. Serially diluted (1:3 in blocking buffer) antibody solutions or cell culture conditioned media, in the presence of 0.8 nM of biotinylated rat 438 or biotinylated rat 351 antibody were applied to the plate.

 After incubation for 2 hours, the plates were washed, as described above,
15 and HRP-conjugated streptavidin (Southern Biotech) diluted 1:5000 in blocking buffer was applied. Incubation with streptavidin was allowed for 30 min before the plates were washed again and developed with TMB solution for 10 minutes. Developing reaction was stopped by adding 0.18M H₂SO₄ and absorbance at 450 nM was measured. Data plotting and analyses were performed with Microsoft Excel
20 and Graphpad-Prizm software.

Table 8 shows EC₅₀ (nM) values of competition ELISA of humanized 438 variants with biotinylated rat 438 antibody for binding to recombinant human Notch1 NRR immunogen. The data shows that multiple variants of humanized 438, including humanized 438 VH1.1/VL1.8, had EC₅₀ values similar to the unlabelled rat
25 438 in the competition ELISA. This demonstrates that the humanized 438 variants compete as well as unlabelled rat 438 with biotinylated rat 438 for the binding to Notch1 NRR immunogen. These results indicate that humanized 438 variants bind to the same or similar epitope on the immunogen as the rat 438 antibody.

Table 8 further shows EC₅₀ (nM) values of the competition ELISA of
30 humanized 438 variants with biotinylated rat 438 antibody for binding to full-length human Notch1 expressed on the cell surface of U-2 OS cells. The data shows that multiple variants of humanized 438, including humanized 438 VH1.1/VL1.8, had EC₅₀ values similar to the unlabelled rat 438 in the competition ELISA. This demonstrates that the humanization 438 variants compete as well as unlabelled rat

438 with biotinylated rat 438 for the binding to full length human Notch1 expressed on cell surface of U-2 OS cells. These results indicate that humanized 438 variants bind to the same or similar epitope on full-length human Notch1 expressed on the cell surface of U-2 OS cells as the rat 438 antibody.

5

Table 8: EC50 (nM) values of competition ELISAs between humanized 438 variants and biotinylated rat 438 on recombinant or cell surface expressed full-length human Notch1

Antibody	Rat 438-mIgG	VH1.0 /VL1.1	VH1.1 /VL1.0	VH1.1 /VL1.1	VH1.1 /VL1.3	VH1.1 /VL1.9	VH1.0 /VL1.8	VH1.1 /VL1.8	VH1.1 /VL1.5	Rat 438-hIgG
Recombinant human Notch1	1.5	0.7	1.1	0.6	2.5	0.4	2.1	1.2	7.0	2.1
Cell surface full-length human Notch1	3.6	4.0	2.8	2.4	2.8	2.2	11.6	3.2	3.3	4.4

10

Table 9 shows EC50 (nM) values of the competition ELISA of humanized 351 variants and biotinylated rat 351 antibody for binding to full-length human Notch1 expressed on the cell surface of U-2 OS cells. The data shows that multiple variants of humanized 351, including humanized 351 VH1.0/VL1.1, had EC50 values similar to the unlabelled rat 351 in the competition ELISA. This demonstrates that

15

humanized 351 variants compete as well as unlabelled rat 351 with biotinylated rat 351 for the binding to full length human Notch1 expressed on cell surface. These results indicate that humanized 351 variants bind to the same, or similar, epitope on full length human Notch1 expressed on the cell surface of U-2 OS cells as the rat 351 antibody.

20

Table 9: EC50 (nM) values of competition ELISAs between humanized 351 variants and biotinylated rat 351 on cell surface expressed full-length human Notch1

Antibody	Rat 351	VH1.0 /VL1.1	VH1.0 /VL1.4	Anti-E. Tenella
Cell surface full-length human Notch1	4.43	2.75	2.11	non-competing

C. Specificity of Binding to Other Human Notch Homologues

25

Other members of the Notch receptor family play important roles in biological processes. For example, Notch2 deficiency leads to embryonic death in mouse models. In contrast, Notch3 deficiency leads to only mild phenotype in distal arteries and Notch4 deficiency results in no detectable phenotype in mouse models. The

closest homologues of the Notch1 NRR region are Notch2 and Notch3 (~50% homology), and Notch4 is a more distant homologue (34% homology). Crossreactivity of anti-Notch1 antibodies to other members of the Notch family, especially Notch2, may lead to undesired effects in patients. Therefore, the potential crossreactivity of rat 438 and humanized 438, along with rat 351 and humanized 351 antibodies to other Notch family members were assessed.

Expression constructs encoding human Notch2 and Notch3 NRR regions, fused with human IgG1 Fc fragment were stably introduced into CHO-PACE cells. Conditioned media from these cells expressing NRR-Fc fusions were collected. Human Notch2 NRR-Fc and human and mouse Notch3 NRR-Fc were purified by protein A affinity followed by size exclusion chromatography (SEC). Purified preparations were dialysed into TBS with 1mM CaCl₂ and analyzed on analytical SEC to be >99% in purity.

As shown in **Table 10**, rat 438 lacked detectable binding to human Notch2 NRR-Fc fusion protein. Further shown in **Table 10**, humanized 438 variants lacked detectable binding to full-length human Notch3 expressed on U-2 OS cell surface, demonstrating that 438 did not cross-react with Notch3.

Table 10. Binding of rat-mIgG1 and humanized 438 variants to Notch2 NRR-Fc and Notch3 U-2 OS cells (N/B represents non-binding).

Binding to Notch2 NRR-Fc		Binding to Notch3 U2-OS cells	
Rat 438-mIgG1	N/B	Rat438-mIgG	N/B
Humanized 438 VH1.0/VL1.1	N/B	A2	N/B
Humanized 438VH1.1/VL1.0	N/B		
Humanized 438VH1.1/VL1.3	N/B		
Humanized 438VH1.1/VL1.5	N/B		
Humanized 438VH1.1/VL1.8	N/B		
Humanized 438VHH1.1/VL1.9	N/B		
A2	N/B		

As shown in **Table 11**, humanized 351 VH1.0/VL1.1 lacked detectable binding to human Notch2 NRR-Fc fusion protein, and to both human and mouse Notch3 NRR-Fc fusion proteins. However, humanized 351 VH1.0/VL1.1 cross-reacted with human, mouse and cyno-Notch1 NRR.

Table 11. Binding of humanized 351 VH1.0/VL1.1 to recombinant human, mouse and cyno-Notch1; human Notch2; and human and mouse Notch3 NRR-Fc fusion proteins (N/B represents non-binding).

IC50 (nM)	Human Notch1 NRR-Fc	Mouse Notch1 NRR-Fc	Cynomolgus Notch1 NRR-Fc	Human Notch2 NRR-Fc	Human Notch3 NRR-Fc	Mouse Notch3 NRR-Fc
Humanized 351 VH1.0/VL1.1	0.249	0.27	0.26	N/B	N/B	N/B

5 D. Binding Affinity to Human Notch1 NRR

The kinetic constants of the anti-Notch1 NRR interactions were determined by surface plasmon resonance (Biacore® T100, Biacore Inc., Piscataway, NJ). Flow cells of a CM5 chip were immobilized with approximately 10,000 Resonance Unit (RU) of anti-human IgG-Fc (Biacore®) in 10mM Glycine, pH 5.0 at 10µl/min for 600
 10 seconds. 10µg/ml of anti-Notch1 humanized 438 variants and humanized 351 variants diluted in TBS with 1mM CaCl₂ were captured at 10µl/min. Association of four concentrations of human Notch1 NRR_Avi_His recombinant protein (from 3.7-100nM) and a zero concentration (running buffer) at 100µl/min were recorded for 3
 15 minutes in TBS with 1mM CaCl₂. Dissociation of the complexes was measured for 10 minutes. The surface of the chip was regenerated by injecting 3M MgCl₂ with 3mM EGTA for 60 seconds at 10µl/min. Curves obtained after subtraction of the reference and buffer signals were fitted to a 1:1 Langmuir binding model with Biacore® T100 Evaluation Software (Biacore®).

The binding affinity of selected humanized 438 variants and humanized 351
 20 variants, and A2 antibody (Wu, Y. et al., Nature 464:1052-1057, 2010) to human Notch1 NRR protein was determined and shown in **Table 12**. Kinetic analysis by Biacore showed similar *k_a* (on) and *k_d* (off) rates for selected humanized 438 variants, including VH1.1/VL1.8 and VH1.1/VL1.3, compared to the A2 antibody.

Kinetic analysis by Biacore further showed higher *k_a* (on) and *k_d* (off) rates
 25 for rat 351 and selected humanized 351 variants, including VH1.0/VL1.1 and VH1.1/VL1.4, compared to the A2 antibody. Although the resulting *K_D* values for rat 351 and selected humanized 351 variants were similar, the differences demonstrated in the *k_a* (on) and *k_d* (off) rates may play a role in the distinct neutralizing activities against Notch1 dependent signaling described in Examples
 30 below.

Table 12. Biacore analysis of rat 438 and humanized 438 variants, along with rat 351 and humanized 351 variants to recombinant human Notch1 NRR protein, in comparison to control A2 antibody. (N/A represents not applicable).

438	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)	K_D (nM)	Fold difference from rat 438
Rat 438-hIgG1	5.27E+04	2.29E-4	4.34E-09	4.34	1.00
438 VH1.1/VL1.3	2.42E+05	4.42E-04	1.83E-09	1.83	0.42
438 VH1.1/VL1.8	2.14E+05	4.49E-04	2.10E-09	2.10	0.48
438 VH1.0/VL1.1	6.05E+04	3.89E-04	6.42E-09	6.4	1.47
438 VH1.1/VL1.0	4.74E+04	1.03E-03	2.18E-08	21.8	5.02
438 VH1.1/VL1.1	4.37E+04	4.22E-04	9.65E-09	9.6	2.21
351	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)	K_D (nM)	Fold difference from rat 351
Rat 351	4.39E+05	1.02E-03	2.33E-09	2.3	1.00
351 V H1.0/VL1.1	4.92E+05	1.55E-03	3.14E-09	3.1	1.35
351 VH1.0/VL1.4	4.58E+05	2.23E-03	4.88E-09	4.9	2.10
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)	K_D (nM)	
A2	1.20E+05	3.53E-04	2.94E-09	2.94	N/A

5 D. Thermal Stability

Thermal stability of a protein or protein domain positively correlates with the stability of the protein or protein domain. A higher melting point of a protein or protein domain often provides improved manufacturability and longer shelf life. Differential scanning calorimetry (DSC) was used for assessing the thermal stability of humanized 438 variants and rat 438-mIgG1. Protein samples were diluted in PBS to 0.3 mg/ml in a volume of 250 μ l. The corresponding formulation buffer blank was used for the reference sample. Both samples were thoroughly degassed using a MicroCal ThermoVac Sample Degassing and Thermostat (Microcal, Inc., Northampton, MA) set to 8°C. Samples were dispensed into the appropriate cells of a MicroCal VP-DSC Capillary Cell MicroCalorimeter (MicroCal, Inc., Northampton, MA). Samples were equilibrated for 4 minutes at 15°C and then scanned up to 100°C at a rate of 100°C per hour. A filtering period of 20 seconds was selected. Raw data was baseline corrected and the protein concentration was normalized. Origin Software (OriginLab Corporation, Northampton, MA) was used to fit the data to an MN2-State Model with an appropriate number of transitions.

As shown in **Table 13** below, all humanized 438 variants had higher thermostability, as displayed by higher melting point, in their Fab region (all above 77°C) compared to rat 438-mIgG1.

Table 13: Thermal Stability (DSC) analysis of humanized 438 variants and rat 438-mIgG1.

	T _m (°C)			ΔT Fab
	CH2	Fab	CH3	
Rat 438-mIgG1	71.82		81.92	—
VH1.0/VL1.8	75.33		84.65	3.5
VH1.0/VL1.1	73.28	77.34	84.59	5.5
VH1.1/VL1.8	72.90	79.26	85.50	7.4
VH1.1/VL1.1	72.96	80.79	85.84	9.0
VH1.1/VL1.5	71.91	80.97	86.21	9.2
VH1.1/VL1.0	72.79	82.90		11.1
VH1.1/VH1.3	72.84	84.00		12.2

5

Example 4

Identification of anti-Notch1 inhibitory antibodies binding epitopes on Notch1 NRR

A. Domain Swap Chimeric Constructs

- 10 As described in Example 3, humanized 438 and humanized 351 variants lacked cross-reactivity with the Notch3 protein. Domain swap chimeric constructs for Notch1 and Notch3 NRR were prepared for epitope mapping of the anti-Notch1 rat 438-mIgG1, rat 351-mIgG1 and A2 antibodies. Expression constructs encoding human Notch3-Notch1 (herein termed Notch 3-1) NRR region domain swap chimera
- 15 with C-terminal Fc fusion (human IgG1 Fc fragment) were individually transfected into CHO-PACE and stable pools expressing each chimera were established. Conditioned media from each stable pool were applied to protein A affinity chromatography, followed by size exclusion chromatography (SEC) for the purification of the chimeric fusion protein. Purified preparations were then dialysed
- 20 into TBS with 1mM CaCl₂ and analyzed on analytical SEC. **FIG. 2** shows recombinant human Notch1 NRR and Notch3 NRR domain swap chimeric constructs for epitope mapping rat 351-mIgG1, rat 438-mIgG1 and A2. As shown in **FIG. 2**, the recombinant NRR chimeric proteins consist of various Notch3 (shown in grey) and Notch1 (shown in black) domains fused to human Fc (not shown).

Relative binding capacities of rat 438-mlgG1 and rat 351-mlgG1 to Notch 3-1 NRR domain swap chimeras were tested with Biacore® SPR technology and the relative Resonance Units (RU) binding capacity of the antibody being tested. The binding of rat 438-mlgG1 and rat 351-mlgG1 to Notch 3-1 NRR chimeras by SPR was determined by surface plasmon resonance (Biacore® 3000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Flow cells of a CM5 chip were immobilized with approximately 10,000 RU each of anti-murine IgG (goat) and goat IgG as a control in 10 mM Glycine, pH 5.0 at 10 µl/min for 600 seconds. Rat 438-mlgG1 and rat 351-mlgG1 antibodies diluted to 1 µg/ml in HBS-P with 0.1 mM CaCl₂ were captured at 10 µl/min for 300 seconds. Approximate capture for each antibody was 150 RU (response 1). Next, 10 µg/ml Notch 3-1 NRR chimeras were injected at 10 µl/min for 300 seconds in the same buffer on the captured rat 438-mlgG1 and rat 351-mlgG1 antibodies and the captured Notch 3-1 NRR was measured (response 2). Dissociation of the complexes after each cycle was achieved using 10 mM Ac pH 1.5 at 30 µl/min for 20 seconds.

As shown in **FIG. 2**, the epitope binding profile of rat 438-mlgG1 and rat 351-mlgG1 to domains of Notch1 NRR are distinct from the binding profile of A2 to domains of Notch1 NRR. More specifically, the binding of A2 to the NRR is more dependent on the LNR-B domain than rat 438-mlgG1. In addition, the binding of rat 351-mlgG1 to the Notch1 NRR is less dependent on the LNR-A and LNR-B domains compared to A2. The differences in domain binding profiles, combined with more detailed information on the differences in the contact residues in Notch1 NRR, and the distinct orientation of the Notch1 NRR in association with rat 438-mlgG1 and A2, as revealed by co-crystal structures described below, demonstrates that rat 438-mlgG1 interacts with Notch1 NRR in a different manner than A2.

B. X-Ray Crystallographic Analysis

Rat 438 and rat 351 were expressed and purified as described above in Example 2. Fab (antigen-binding fragment) was generated from rat 438 and rat 351 using the Pierce Fab Preparation Kit (immobilized papain), product # 44685. Rat 438 and rat 351 were incubated with immobilized papain for 24 hours at 37°C. The Fab was purified by desalting with a Zeba column (Pierce) equilibrated with 50 mM Tris pH 8.0. The Fab was collected in the flow-through from Q FF column equilibrated with 50 mM Tris pH 8.0.

The resulting Fab fragment was mixed with the human Notch1 NRR protein at a molar ratio of 1:1.2 with the addition of 0.9 mM CaCl₂ and incubated on ice for 30 minutes before purification on an S200 size exclusion column equilibrated with 25 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.9 mM CaCl₂. Fractions from the predominant
5 peak containing the Fab:NRR complex were pooled and concentrated to 11 mg/ml using a 10 K_D cutoff Vivaspin HY concentrator (Sartorius). The Fab:NRR complex was crystallized using the hanging drop vapor diffusion method.

For rat 438, limited proteolysis of the complex using chymotrypsin was required in order to obtain crystals. The complex was first mixed with chymotrypsin
10 to a final concentration of 2 ug/ml and then combined with an equal volume of well solution consisting of 100 mM sodium cacodylate pH 5.5, 14-20 % PEG 8000, 100-200 mM calcium acetate. Crystals appeared within a week and continued to grow for 3 weeks. For rat 351, the complex was combined with an equal volume of well solution consisting of 20 % PEG 3350, 200 mM sodium sulfate. Crystals appeared
15 after one week and continued to grow for 3 weeks.

Crystals were cryo-protected by swiping through well solution with the addition of 25% glycerol. X-ray data was collected at SER-CAT beamline 22BM for rat 438 and 22ID for rat 351 at the Advanced Photon Source and processed to a resolution of 2.6 Angstrom using the HKL-2000 (HKL Software) software package.
20 The structure was solved by molecular replacement using Phaser software. The search models were taken from pdb id 3L95 for the Notch1 NRR, 2HRP for the heavy chain and 1xgp for the light chain of rat 438, and 1BM3 for the heavy chain and 3L95 for the light chain of rat 351. The resulting model was rebuilt and refined using coot and BUSTER (Global Phasing, Ltd.) including soft NCS restraints. The
25 structure was validated using molprobity. Residues involved in interactions were determined using the pymol and PISA.

A structural view of the rat 438 epitope on the human Notch1 NRR is shown in **FIG 3**, and the rat 351 epitope on the human Notch1 NRR is shown in **FIG. 4**. A similar X-ray crystallographic analysis was completed using published data for the
30 A2 antibody and **FIG. 5** shows the structural view of the A2 epitope on the human Notch1 NRR. For FIGS. 3-5, amino acid residues within 3.8 angstroms of the antibody are shown in black. **Table 14** below provides the residues involved in Notch1 NRR antibody interactions for rat 438, rat 351 and A2.

The data shows that rat 438 and A2 bind overlapping but distinct surfaces within the Notch1 NRR. Both epitopes include the central HD domain. Rat 438 and A2 interact with LNR-A, however rat 438 interacts with a larger surface. Only rat 438 interacts with the S1 loop region and only A2 interacts with LNR-B. More

5 specifically, the data shows that rat 438 binds to human Notch1 NRR residues 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, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 and Leu 1718.

The data also shows that rat 351 and A2 bind overlapping but distinct
10 surfaces within the Notch1 NRR. In particular, only rat 351 interacts with the S1 loop region and only A2 interacts with LNR-B. Rat 351 and A2 both interact with LNR-A, however rat 351 interacts with a distinct subset of LNR-A amino acids. More specifically, the data shows that rat 351 binds to the human Notch1 NRR residues Asp 1458, Asn 1461, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Met 1581, Pro 1582,
15 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.

The x-ray crystal structure of rat 438 and rat 351 residues binding to Notch1 NRR were further analyzed using the program PISA. The data shows that rat 438 formed strong electrostatic interactions (salt bridges) with the residues Lys1718 and
20 Arg1673. Notch1 NRR residues that formed hydrogen bonds with the rat 438 antibody were Asn1461, Asp1671, Arg1673, Leu1713, Lys1718, Cys1464, Ala1708, and Ser1712. The Notch1 NRR residues that contribute more than 40 Angstrom² of buried surface area upon formation of the complex with rat 438 antibody were Arg1673, Val1463, Lys1462, Gly1622, Asp1671 from the interaction with the heavy
25 chain, and Leu1466, Lys1718, Gly1711, Cys1464, Pro1716, and Val1463 from the interaction with the light chain. Of the residues identified, rat 438 binds to human Notch1 NRR at least at residues Asn1461, Val1463, Lys1462, Asp1671, Arg1673, Leu1713, and Lys1718.

The data shows that rat 351 forms strong electrostatic interactions (salt
30 bridges) with residues Asp1458 and Arg1673. Notch1 NRR residues that formed hydrogen bonds with the rat 351 antibody were Asp1458, Val1463, Cys1464, Ser1465, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Gly1711, Ser1712, Leu1713, and Asn1714. The Notch1 NRR residues that contribute more than 40 Angstrom² of buried surface area upon formation of the complex with rat 351 were Val1463,

- Cys1464, Leu1466, Gly1711, Asn1714, Pro1716, and Lys1718 from the interaction with the light chain, and Asn1461, Leu1580, Asp1671, and Arg1673 from interactions with the heavy chain. Of the residues identified, rat 351 binds to human Notch1 NRR at least at residues Asp1458, Val1463, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Ser1712, and Leu1713. Further, A2 does not interact with residues Asp1458, Val1463, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Ser1712, and Leu1713.

Table 14. Residues of rat 438 and rat 351 involved in human Notch1 NRR antibody interactions

	Human Notch1 NRR Residue			Rat 351 Residue			Rat 438 Residue			A2 Residue		
LNR-A	ASP	1458	ARG	58	H							
	ASN	1461	ARG	58	H	TYR	58	H				
			TRP	94	L							
	LYS	1462				TYR	58	H				
						TYR	100A	H				
	VAL	1463	TRP	94	L	TYR	58	H				
						THR	100B	H				
	CYS	1464	ASN	92	L	ASN	92	L	TYR	49	L	
			SER	93	L	SER	93	L	PHE	53	L	
			TRP	94	L	TRP	94	L				
	SER	1465				TRP	94	L	TYR	49	L	
	LEU	1466	ILE	2	L	ASP	1	L	SER	96	H	
			GLN	27	L	ILE	2	L	PHE	98	H	
			SER	93	L	GLN	27	L	TYR	49	L	
LNR-B						SER	93	L				
						TRP	94	L				
	GLN	1467							SER	56	L	
	ASN	1469							PHE	98	H	
	LYS	1499							SER	30	H	
									SER	31	H	
									ASN	52	H	
	TYR	1500							PRO	53	H	
									ASN	54	H	
	PHE	1501							ARG	99	H	
	SER	1502							ARG	99	H	
	ASP	1503							ARG	50	H	
									ASN	52	H	
									ASN	54	H	
									SER	56	H	
	HIS	1505							ARG	99	H	
									ASN	54	H	
									SER	56	H	
	ASP	1507							ASN	54	H	

S1 Loop	LEU	1580	PHE	98	H	PRO	97	H	
	MET	1581	GLN	53	L				
	PRO	1582	PHE	98	H				
	TYR	1621	ARG	52A	H	TYR	99	H	
	GLY	1622	ARG	52A	H	TYR	99	H	
	ARG	1623	ARG	52A	H				
	ASP	1671	TYR	32	H	TYR	98	H	
			GLN	97	H	TYR	99	H	
						GLY	100	H	
	VAL	1672	GLN	97	H	PRO	97	H	
			PHE	98	H	TYR	98	H	
						TYR	99	H	
						GLY	100	H	
	ARG	1673	HIS	31	H	PRO	97	H	
			TYR	32	H	TYR	98	H	
			ARG	52A	H	TYR	99	H	
			GLU	95	H	GLY	100	H	
			GLY	96	H				
			GLN	97	H				
			PHE	98	H				
	GLY	1674	PHE	98	H				
HD Core	LEU	1707				ASN	30	L	
	ALA	1708				ASN	30	L	PHE 98 H
	SER	1709							GLY 97 H
									PHE 98 H
	LEU	1710	LYS	28	L	ARG	28	L	GLY 97 H
									PHE 98 H
									ARG 99 H
	GLY	1711	LYS	28	L	ARG	28	L	PHE 98 H
			SER	30	L	ASN	30	L	
						GLY	68	L	
	SER	1712	LYS	28	L	ARG	28	L	
			SER	30	L	ASN	30	L	
	LEU	1713	SER	30	L	ASN	30	L	
	ASN	1714	SER	30	L	ASN	30	L	PHE 91 L
			SER	67	L	SER	67	L	TYR 92 L
			GLY	68	L				
	ILE	1715	THR	31	L				TYR 92 L
	PRO	1716	GLN	53	L	GLN	53	L	ASP 28 L
									TYR 92 L
	TYR	1717				GLN	53	L	
	LYS	1718	ASN	32	L	ASP	32	L	ALA 99 H
			TYR	50	L	PHE	50	L	TYR 100 H
			GLN	53	L	GLN	53	L	

FIG. 6 shows the superposition of the structures of human Notch1 NRR bound to rat 438 and A2 antibodies; the human Notch 1 NRR is at the bottom. The heavy chains of rat 438 and A2 are shown in black and the light chains, in grey, are in between the two heavy chains. As shown in **FIG. 6**, the orientation of rat 438 and A2 antibodies relative to the NRR is rotated by almost 180 degrees so that the light chain N-terminus of rat 438 points towards LNR-A whereas the light chain of A2 points towards LNR-C (in back region of Notch1 NRR). This places the heavy chains on opposite sides of the two light chains from the point of view of the NRR. The A2 heavy chain is therefore on the opposite side of the light chain from the S1 loop.

FIG. 7 shows the superposition of the structures of human Notch1 NRR (shown as ribbons) bound to rat 351 and A2 antibodies (shown as molecular surfaces). The heavy chains of rat 351 and A2 are shown in black. The light chain of rat 351 is shown in dark grey and the light chain of A2 is shown in light grey. **FIG. 7** shows that rat 351 and A2 antibodies bind in opposite orientations confirming their association with unique epitopes.

Example 5

20

Functional characterization of anti-Notch1 inhibitory antibodies in cell-based assays.

A. EDTA-treatment in Notch1 reporter gene assay

In the absence of ligand, the heterodimeric S1-cleaved Notch1 receptor remains inactive at the cell membrane. The Notch1 NRR domains adopt an auto-inhibitory conformation by burying cleavage site 2 (S2), thus preventing access to metalloproteases. The Notch1 NRR domains associate through non-covalent interactions that are stabilized by divalent cations such as calcium. However, the inhibitory interactions of the Notch1 NRR domains can be disrupted by the chelating agent EDTA. Calcium chelation by EDTA results in rapid shedding of the extracellular domain from the cell membrane and is sufficient to activate Notch1 signaling (Rand et al., Mol. Cell. Biol. 20(5):1825-35, 2000).

30

To determine whether anti-Notch1 inhibitory antibodies stabilize the Notch1 NRR in an inactive conformation upon chelation of divalent cations, Notch1-reporter

cells (see section B below) were pre-incubated with rat 438-mlgG1, rat 351-mlgG1 or A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody and then treated with 5 mM EDTA. Human Notch1 reporter cells were plated in white-walled 96 well plates at 40,000 cells per well and cultured overnight in McCoy's 5A medium, 10% FBS, Pen/Strep/Glutamine. Medium was removed by aspiration and replaced with medium containing rat 438-mlgG1, rat 351-mlgG1 or A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody at 0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 30 µg/ml for 1 hour at room temperature. Following the 1 hour antibody pre-treatments, EDTA was added to the cells at a final concentration of 5 mM and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 6 hours. The Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) was used to measure the activities of the 8xCSL Firefly-luciferase (Notch1-induced) and *Renilla*-luciferase (constitutive) reporters. The luminescent readings from Firefly-luciferase were divided by the *Renilla*-luciferase readings to calculate the levels of Notch1 signaling. An average of 3 replicates from each treatment was calculated and plotted along with standard deviations.

Table 15 shows the Notch1 reporter gene assay performed with increasing concentrations of rat 438-mlgG1, rat 351-mlgG1 and A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody, in the presence of the chelating agent EDTA and absence of ligand. The data shows that the addition of EDTA alone to the Notch1-reporter cell line stimulates activation of the Firefly-luciferase reporter gene (see 0 µg/ml condition). As expected, the control anti-E.tenella antibody did not inhibit Notch1 signaling. In contrast, pre-treatment of the cells with increasing concentrations of rat 438-mlgG1, rat 351-mlgG1 and A2 antibodies each inhibited activation of the Firefly-luciferase reporter gene in a dose-dependent manner in the presence of EDTA. At 1 µg/ml, 10 µg/ml and 30 µg/ml concentrations, the Firefly to *Renilla*-luciferase ratios of the rat 351-mlgG1, rat 438-mlgG1 and A2 treatments were significantly lower than control anti-E.tenella, indicating inhibition of Notch1 signaling.

Table 15. Notch1 reporter gene assay performed with increasing concentrations of rat 438-mlg1, rat 351-mlgG1 or A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody in the presence of the chelating agent EDTA and absence of ligand.

Antibody Concentration	Firefly/ <i>Renilla</i> Luminescence					
	0 µg/mL	0.01 µg/mL	0.1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
rat 351-mlgG1	315.2	303.9	202.1	84.8	62.1	57.0
rat 438-mlgG1	333.5	338.2	245.5	116.9	54.3	46.9

A2	307.1	312.3	172.5	89.9	63.5	55.2
ANTI-E.TENELLA	266.7	267.2	299.0	278.4	257.1	229.0
	Standard Deviations					
rat 351-mIgG1	37.3	23.7	33.6	6.6	2.0	4.8
rat 438-mIgG1	20.5	13.2	9.9	14.5	9.0	9.0
A2	25.0	17.7	10.7	14.9	7.8	8.0
ANTI-E.TENELLA	16.5	34.1	48.4	27.0	23.1	6.2

B. Cell line construction for Notch1 reporter gene co-culture assay

The inhibitory activities of anti-Notch1 humanized 438 and humanized 351 antibodies were tested in a Notch1 reporter gene co-culture assay, described in Example 2. Humanized 438 and humanized 351 antibodies were pre-incubated with Notch1 reporter cells and then co-cultured with DLL4-HEK293 cells to activate Notch1 signaling or with parental HEK293 cells as a control.

To generate the Notch1 reporter cell line, a series of three sequential, stable transfections were performed in the U-2 OS human osteosarcoma cell line (ATCC, Manassas, VA). The first transfection used a vector for expression of full-length human Notch1 or mouse Notch1 based on the pCMV6-Entry-Myc-Flag backbone (Origene), and in both the correct DNA sequences of the Notch1 inserts were confirmed. Following transfection with the *TransIT*-LT1 transfection reagent (Mirus, Madison, WI), U-2 OS cells were selected in G418 and clonal lines were isolated. Second, stable Notch1-expressing U-2 OS clones were re-transfected with the pGL4.27 [*luc2P*/minP/Hygro] vector (Promega, Madison, WI) containing eight tandem copies of the CSL enhancer sequence (CGTGGGAAAAT), selected in Hygromycin B plus G418 and clonal lines were isolated. The 8xCSL Firefly-luciferase reporter construct is responsive to activated Notch1 signaling (for example, see, Jeffries et al., Mol. Cell. Biol. 22(11):3927-3941, 2002). Thirdly, the Notch1-pGL4.27 U-2 OS cells were re-transfected with pGL4.74 [*hRluc*/TK] vector (Promega) plus the Linear Puromycin Marker (Clontech, Mountain View, CA), selected in Puromycin, Hygromycin B and G418, and clonal lines were isolated. The pGL4.74 vector encoded the *Renilla*-luciferase gene that is constitutively expressed from an HSV-TK promoter and served as an internal control. The triple stable transfected U-2 OS line (termed "Notch1 reporter cells" herein) was maintained in McCoy's 5A medium (Gibco, Grand Island, NY) containing 10% FBS, 1X

Penicillin/Streptomycin/L-Glutamine (Gibco), 0.25 mg/ml G418 sulfate, 0.3 mg/ml Hygromycin B and 0.001 mg/ml Puromycin.

To generate the ligand-expressing cells, HEK293 cells (ATCC) were transfected with vectors for expression of human DLL4 or mouse DLL4. Both
5 vectors were based on the pCMV6-AC-HA-His backbone (Origene, Rockville, MD), and the correct DNA sequences of the DLL4 inserts were confirmed. Following transfection, HEK293 cells were selected in 0.5 mg/ml G418, and clonal lines were isolated, expanded and analyzed for DLL4 expression. Clones with high DLL4
10 expression and high induction of Notch1 reporter activity in the U-2 OS cells were used to assess the inhibitory effect of anti-Notch1 antibodies.

The luminescent readings from Firefly-luciferase were divided by the internal control *Renilla*-luciferase reading to normalize the signals (termed "F/R ratio" herein). To calculate the fold-induction of Notch1 signaling, the F/R ratios generated from the DLL4-HEK293 co-culture reporter assays were divided by the F/R ratios
15 from the parental HEK293 co-cultures and termed relative luciferase unit (RLU) or activity.

A titration of humanized 438 VH1.1/VL1.8 and A2 in the human and murine Notch1 reporter co-culture assays demonstrated potent inhibition of Notch1 signaling in a dose-dependent manner. **FIGS. 8 and 9** show the neutralizing activity of
20 humanized 438 VH1.1/VL1.8 and rat 438 antibodies against Notch1 dependent signaling in human and mouse Notch1 reporter cells, respectively. Humanized 438 VH1.1/VL1.8 showed equivalent neutralizing activity to that of rat 438, in both human and mouse Notch1 dependent signaling reporter assays. Therefore, humanized 438 VH1.1/VL1.8 fully retained the neutralizing activity of rat 438.

25 The IC₅₀ (nM) values of rat 438-mIgG1 and humanized 438 variants were calculated from the inhibition of Notch1 dependent signaling from the Notch1 reporter gene co-culture assays, as provided in **Table 16** below. Humanized 438 VH1.1/VL1.8 showed the most significant level of inhibition against both human and mouse Notch1 signaling, as represented by the lowest IC₅₀ values among all
30 humanization 438 variants.

Table 16. IC₅₀ (nM) values of rat 438-mIgG1 and humanization 438 variants. (n.d = not determined)

Antibody	A2	r438- mIgG	VH1.0/ VL1.1	VH1.1/ VL1.0	VH1.1/ VL1.1	VH1.1/ VL1.3	VH1.1/ VL1.9	VH1.0/ VL1.8	VH1.1/ VL1.8	VH1.1/ VL1.5	r438- hIgG
Human Notch1	0.31	0.68	1.19	0.46	0.657	0.45	0.38	1.87	0.17	0.35	0.65
Mouse Notch1	0.32	0.71	nd	nd	nd	0.62	nd	1.37	0.46	0.50	nd

5 The inhibitory effects of rat 351 and A2 anti-Notch1 antibodies on the co-culture reporter assay were examined by adding increasing concentrations of antibody over a range from about 0.01 nM to 200 nM. To calculate the percent (%) inhibition of anti-Notch1 antibody treated co-cultures, the RLU from increasing concentrations of antibody treatments were divided by an untreated control using the
10 formula $(1 - (\text{treated}/\text{untreated}) * 100)$.

A titration of rat 351 and A2 antibodies in human and murine Notch1 reporter co-culture assays demonstrated rat 351's unique neutralizing activity against Notch1 signaling. As shown in **FIGS. 10, 11 and Table 17**, both rat 351 and A2 inhibited Notch1 signaling in a dose-dependent manner and had similar IC₅₀ values
15 calculated from the Notch1 reporter co-culture assays. **Fig. 10 and Table 17** show that A2 achieved a maximal inhibition (plateau inhibition) of Notch1 signaling at about 100% in human Notch1 reporter co-culture assays when antibody concentrations were greater than 20 times the IC₅₀ value. In contrast, rat 351 achieved a maximal inhibition of only about 85%, which was lower than the maximal
20 inhibition observed for A2. Rat 351 failed to achieve 100% maximal inhibition even when antibody concentrations were 250 times the IC₅₀ value. **Fig. 11 and Table 17** show that similar results were observed for the mouse Notch1 reporter co-culture assays. A2 achieved a maximal inhibition of Notch1 signaling at about 86% in mouse Notch1 reporter co-culture assays. In contrast, rat 351 achieved a maximal
25 inhibition of only about 55%, which is lower than the 86% maximal inhibition observed for A2.

Table 17. Neutralizing activity of rat 351 and A2 antibodies against human and murine Notch1-dependent signaling in a reporter gene assay

Antibody	Neutralization activity (Human RGA)		Neutralization activity (murine RGA)	
	IC50 (nM)	% Inhibition	IC50 (nM)	% Inhibition
Rat 351	0.4	~85%	0.3	55%
A2	0.3	~100%	0.2	86%

FIGS. 12 and 13 show the neutralizing activity of humanized 351 variants and rat 351-mlgG1 in both human and mouse Notch1 dependent signaling reporter assays, respectively. **Table 18** provides the IC50 (nM) values of humanized 351 variants, rat 351-mlgG1 and A2 calculated from the inhibition of Notch1 dependent signaling from the Notch1 reporter gene co-culture assays. The data shows that humanized 351 VH1.0/VL1.1 exhibited a neutralizing activity profile that is similar to rat 351-mlgG1 and rat 351. Humanized 351 VH1.0/VL1.1 achieved a maximal inhibition of Notch1 signaling at about ~87.4%, which is lower than the maximal inhibition observed for A2.

Table 18. Neutralizing activity of rat 351-mlgG1 and humanized 351 variants against human and murine Notch1-dependent signaling in a reporter gene assay

Antibody	Neutralization activity (Human RGA)		Neutralization activity (murine RGA)	
	IC50 (nM)	% Inhibition	IC50 (nM)	% Inhibition
Rat 351-mlgG1	0.22	~85.4%	0.42	~ 51%
Humanized 351 VH1.0/VL1.1	0.19	~ 87.4%	0.38	~ 48%
Humanized 351 VH1.0/VL1.4	0.17	~ 85.4%	0.49	~ 46%
A2	0.27	~99.1%	0.36	~82%

Example 6

Structural and functional basis for neutralizing activity of clone 351

A Ca^{2+} bound in each of the LNR-A, B, and C domains of the Notch1 NRR is required for maintaining the integrity of the Notch1 NRR structure. Removal of Ca^{2+} , for example, by addition of EDTA to the media of Notch1 expressing cells, leads to the destabilization of the Notch1 NRR structure. This results in the exposure of the

S2 metalloproteinase cleavage site in the Notch1 NRR and activation of Notch1 signaling (Rand et al., Mol. Cell. Biol. 20(5):1825-35, 2000).

The co-crystal structure of rat 351 Fab with human Notch1 NRR has four independent complexes in a single crystal. However, only one of the four complexes contained the expected Ca^{2+} bound to the LNR-A. **FIG. 14A** shows the interaction of rat 351 and human Notch1 NRR in the LNR-A region of complex 1. In this structure, a negatively charged residue in Notch1 NRR, Asp1458, had an ionic interaction with the calcium present in the structure. **FIG. 14B** shows the interaction of rat 351 and human Notch1 NRR in the LNR-A region of Complex 2. Complex 2 is a representative image of Complexes 2-4. In Complexes 2-4, instead of having an ionic interaction with calcium, the Asp1458 of the human Notch1 NRR formed a salt bridge with a positively charged residue in the rat 351 VH CDR2, Arg58. This indicated that the positively charged Arg58 of rat 351 is competing with the positively charged Ca^{2+} for binding to the negatively charged Asp1458 of the human Notch1 NRR.

To demonstrate the significance of the positively charged residue Arg58 in the functional properties of rat 351, mutant rat 351-mIgG1 antibodies were generated in which the Arg58 in the VH was mutated to a neutral residue, Tyr (as well as Arg58-Tyr in combination with Val60-Ala or Arg). The mutant rat 351-mIgG1 antibodies were tested in Notch1 signaling inhibition reporter assays and the results are shown in **FIG. 15** and **Table 19**. As shown, rat 351 achieved a maximal inhibition of only about 87%, while mutant rat 351-mIgG1 and A2 achieved a higher maximal inhibition of ~95% and ~98%, respectively.

Table 19. IC₅₀ (nM) and maximal inhibition(%) values for rat 351, mutant rat 351 and A2

Antibody	A2	Rat 351 wt	Rat 351 VH R58Y	Rat 351 VH R58Y/V60A	Rat 351 VH R58Y/V60R
IC ₅₀ (nM)	0.18	0.19	0.21	0.16	0.11
Maximal Inhibition (%)	97.7%	87.5%	95.3%	95.3%	95.3%

Example 7

Effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies on endothelial cell sprouting, angiogenesis and vascularization

5

A. *In vitro* evaluation of anti-Notch1 inhibitory antibodies

The effect of anti-Notch1 inhibitory antibodies on angiogenesis was examined in an *in vitro* model of endothelial cell sprouting using a human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) fibrin gel bead assay (FGBA) (also termed the HUVEC-FGBA herein). A modified version of the HUVEC-FGBA was performed essentially as described by Nakatsu, et al. (*Microvasc. Res.* 66 (2):102-112, 2003), except primary human lung tumor-associated fibroblasts (LTAFs) were substituted for Detroit 551 skin fibroblasts. HUVEC sprouts were examined 10-15 days after addition of fibroblasts.

Human lung tumor tissue (sample 87852A1; Asterand, Detroit, MI) was mechanically and enzymatically disaggregated. Cells were sieved through a 40 µm cell strainer to obtain a single cell suspension. Viable cells were isolated following treatment with red blood cell lysis buffer (Roche, Indianapolis, IN) and magnetic separation from dead cells (Milenyi Biotec, Auburn, CA). Primary lung tumor-associated fibroblasts were established and maintained in RPMI medium containing 20% FBS.

The LTAF-containing HUVEC-FGBAs were treated with rat 438, rat 351 or A2 antibodies. Medium alone (untreated) and anti-VEGF inhibitor AVASTIN (Genentech, So. San Francisco, CA) control treatments were also included. **FIG. 16** shows representative epifluorescent images of CD31-Cy3 immunostaining at day 10 of rat 438, rat 351 and A2 treated HUVEC-sprouts. An increase was demonstrated in HUVEC sprouting and vessel lengths of rat 438 and rat 351 treatment compared to the medium alone (untreated) control. In contrast, treatment with anti-VEGF inhibitor AVASTIN prevented HUVEC sprouting altogether. Thus, inhibition of Notch1 signaling with rat 438 and rat 351 de-regulated angiogenesis in a manner distinct from anti-VEGF inhibitors, such as AVASTIN.

Furthermore, **Table 20** shows that rat 438 and rat 351 increased the average number of sprout branch points per bead compared to control anti-E.tenella antibody in a HUVEC-FGBA on day 6 and day 12 of treatment. However, the effect of rat 351

on the average number of branch points per bead was lower on day 6 compared to rat 438 and A2. By day 12, both rat 438 and rat 351, as well as A2, induce a similar number of branch points per bead. During angiogenesis, active Notch1 signaling negatively regulates the number of endothelial tip cells and thus modulates the levels of branching and sprouting (Hellstrom, M. et al., *Nature* 445 (7129):776-780, 2007).

Table 20. Average number of branch points/bead in rat 351, rat 438 and A2 treatment in a HUVEC-FGBA.

Day 6				
	Rat 351	Rat 438	A2	ANTI-E.TENELLA
Average number of branch points/bead	2.7	6.1	5.9	1.3
Standard deviation	1.3	1.8	2.1	1.1
Day 12				
	Rat 351	Rat 438	A2	ANTI-E.TENELLA
Average number of branch points/bead	9.3	11.2	10.6	1.2
Standard deviation	1.8	2.6	2.3	1.1

B. *In vivo* evaluation of anti-Notch1 inhibitory antibodies

The effect of anti-Notch1 inhibitory antibodies was further examined in an *in vivo* mouse assay of angiogenesis and vascularization. The neonatal retina is a well-characterized model of angiogenesis and has been used to study the role of the Notch pathway in this process. There is extensive angiogenesis in the mouse retina starting at birth. As in the human retina, the vasculature originates from the optic nerve and spreads to form a network of vessels which then sprout downward to establish a secondary network. Genetic and pharmacological manipulation of Notch signaling has demonstrated that proper Notch signaling is required for angiogenesis in the neonatal retina (Hellstrom, M. et al., *Nature* 445(7129):776-780, 2007).

Pregnant CD-1 mice were housed individually and monitored regularly for the birth of the litter. For rat 438-mIgG1, pups were dosed 1 and 3 days after birth with either 10 mg/kg of control anti-E.tenella antibody, 10 mg/kg of rat 438-mIgG1 or 10 mg/kg of A2. For rat 351-mIgG1, pups are dosed at 1 and 3 days after birth with either 30 mg/kg of control anti-E.tenella antibody, 30 mg/kg of rat 351-mIgG1 or 30 mg/kg of A2.

On day 5 after birth, pups were euthanized and the eyes were harvested and fixed overnight in 2% formaldehyde. The following day, the eyes were transferred to PBS and the retinas were isolated. To stain the retinas, Isolectin B4 (Sigma, St. Louis, MO) was conjugated to Alexa Fluor 488 with a labeling kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and used at 15 mg/ml in PBS with 10% goat serum, 1% Triton X-100, 0.1% sodium azide, and 0.1 mM each of CaCl_2 , MgCl_2 and MnCl_2 . Retinas were washed 5 times in PBS with 1% Triton X-100, 0.1% sodium azide, and 0.1 mM each of CaCl_2 , MgCl_2 and MnCl_2 and a final time in PBS with 0.1% sodium azide, and 0.1 mM each of CaCl_2 , MgCl_2 and MnCl_2 . Retinas were cut and mounted with Fluormount-G (EMS, Hatfield, PA) and imaged on a Zeiss LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging, LLC, Thornwood, NY). **FIG. 17** shows representative confocal images of Isolectin B4-Alexa488 staining in a mouse retinal model of angiogenesis after treatment with rat 438-mlgG1, rat 351-mlgG1 and A2. Anti-E.tenella antibody and no treatment controls were also included.

As shown in **FIG. 17**, the retina from a mouse pup in the rat 438-mlgG1 treatment group had different vasculature compared to the retinas from mouse pups in the anti-E.Tenella antibody and no treatment control groups. This indicates that rat 438-mlgG1 antibody disrupted angiogenesis *in vivo*. In particular, the retinas from rat 438-mlgG1 treatment group showed more extensive vasculature, similar to that previously reported after genetic and pharmacological manipulation of Notch signaling (Hellstrom, M. et al., *Nature* 445 (7129):776-780, 2007). This indicates that inhibition of Notch1 signaling with rat 438-mlgG1 directly impacted angiogenesis in the mouse neonatal retina.

Further shown in **FIG. 17**, the retina from a mouse pup in the rat 351-mlGg1 treatment group had similar vasculature compared to the retinas from mouse pups in the anti-E.Tenella antibody and no treatment control groups. In contrast, the retina from the A2 group showed more extensive vasculature, similar to that previously reported after genetic and pharmacological manipulation of Notch signaling (Hellstrom, M. et al., *Nature* 445 (7129):776-780, 2007). This demonstrates that, in contrast to A2, rat 351-mlgG1 antibody did not significantly disrupt murine angiogenesis *in vivo* or that the potential effect of rat 351-mlgG1 on the murine vasculature was not observed at the chosen time point or with the tested dosing regimen.

Example 8Effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies on cell lines having native and mutant Notch1 receptors

5

A. Effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies on Notch1 activation in human fibroblast cell line CCD1076SK having native Notch1 receptors

Notch1 signaling is activated by ligand binding which induces conformational
10 changes within the extracellular Notch1 NRR domains thereby exposing metalloprotease and gamma-Secretase cleavage sites. Proteolysis results in the release of the Notch1 intracellular domain (Notch1^{ICD}), a transcriptional activator, from the cell membrane. Notch1 activation and Notch1^{ICD} release were examined by Western blot analysis of protein extracts generated from the human fibroblast cell
15 line CCD1076SK that was plated on recombinant human DLL4 ligand treated with increasing concentrations of rat 438, rat 351 or A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody for 24 hours. Released Notch1^{ICD} molecules initiating at a Valine residue were detected with the D3B8 antibody (anti-Notch1^{ICD}) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

20 To activate Notch1 signaling, the CCD1076SK skin fibroblasts were cultured in the presence of DLL4 ligand. Six-well plates were coated with 2 µg/ml of recombinant human DLL4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) in 1X DPBS containing CaCl₂ and MgCl₂. The 2x10⁶ CCD1076SK skin fibroblasts in DMEM medium containing 10%FBS were added to the recombinant human DLL4-coated wells in the
25 presence of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 µg/ml of rat 438, rat 351 and A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody. Cells were incubated with the antibodies for 24 hours at 37°C in 5% CO₂. Cells were lysed in 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 0.025 M Tris-HCl, pH 7.5, containing Complete Mini Protease inhibitor cocktail (Roche) and 0.4 mM PMSF. Extracts were
30 resolved by SDS-PAGE on a 7.5% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose paper using an iBlot Gel transfer system (Invitrogen). The released Notch1^{ICD} molecules initiating at a Valine a residue were detected with anti-Notch1^{ICD} and, as a loading control, anti-beta-actin using standard western blot procedures. Densitometric analysis was performed on films that were scanned with
35 a BioRad GS-800 Calibrated Densitometer and analyzed with Quantity One version

4.6.9 software (BioRad). Notch1^{ICD} levels were normalized to beta-actin control in each sample and then compared to the untreated control.

As shown in **FIG. 18**, titration of rat 438 potentially inhibited Notch1 activation in a dose-dependent manner, as indicated by the levels of released Notch1^{ICD}

5 detected. Further shown in **FIG. 18** and in **Table 21**, titration of rat 351 up to 10 µg/mL demonstrated lower inhibition of Notch1 activation of a native Notch1 receptor compared to A2, as indicated by the levels of released Notch1^{ICD} detected. At all concentrations, and in particular beginning at 0.1 µg/mL, rat 351 demonstrated higher levels of released Notch1^{ICD} compared to A2.

10

Table 21. Densitometric analysis of Notch1^{ICD} levels from Western blot of **FIG. 18**

Ab, µg/ml	Normalized Notch1 ^{ICD} levels	
	Rat 351	A2
0	1.000	1.000
0.001	0.826	0.748
0.01	0.848	0.402
0.1	0.554	0.003
1	0.393	0.003
10	0.302	0.006

B. Effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies on Notch1 activation in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells line having mutant Notch1 receptors

15

Constitutive Notch1 activation and release of the Notch1 intracellular domain (Notch1^{ICD}) is reported in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) patients and T-ALL cell lines that harbor mutations within the NRR domain of the Notch1 receptor (Weng et al., Science 306:269-271, 2004). These mutations are categorized into 3 major classes. Class 1 mutations are single amino acid substitutions and small in-frame deletions or insertion in HD1. Class 2 mutations are longer insertions in the distal region of HD2 that relocate the S2-metalloprotease cleavage site beyond the auto-inhibitory NRR domain. Class 3 mutations, also called Juxtamembrane Expansion Mutations (JMEs), displace the NRR away from the cell membrane.

25

T-ALL cell lines with Notch1 receptor class 1 mutations tested include HPB-ALL cells with a leucine to proline mutation at amino acid 1575 (L1575P), ALL-SIL

cells with a leucine to proline mutation at amino acid 1594 (L1594P), MOLT-4 cells with a leucine to proline mutation at amino acid 1601 (L1601P) and DND-41 cells with compound class 1 mutations of leucine to proline at amino acid position 1594 and aspartic acid to valine at amino acid position 1610 (L1594P/ D1610V). The
5 CCRF-CEM cell line harbors a class 2 mutation and possesses a 12 amino acid insertion at position 1595. The Jurkat cell line harbors a class 3 JEM mutation that inserts 17 amino acids at position 1740.

Notch1 activation and Notch1^{ICD} release was examined by Western blot analysis of protein extracts generated from the T-ALL cell lines treated with
10 increasing concentrations of rat 438-mIgG1, humanized 438 VH1.1/VH1.8, rat 351-mIgG1 or A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody. Released Notch1^{ICD} molecules initiating at a Valine residue are specifically detected with D3B8 antibody (anti-Notch1^{ICD}).

The T-ALL cell lines HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4, DND-41 and
15 Jurkat cells were used instead of CCD1076SK fibroblasts as described above. Since T-ALL cells possess constitutively released Notch1^{ICD}, no exogenous DLL4 ligand was required. Suspension cultures of 2x10E6 T-ALL cells were mixed with 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 µg/ml of rat 438-mIgG1, humanized 438 VH1.1/VH1.8, rat 351-mIgG1 or A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody in RPMI 1640
20 medium containing 10% FBS, Pen/Strep/Glutamine. Cells were incubated with the antibodies for 24 hours at 37°C in 5% CO₂. Cells were harvested by centrifugation and medium was removed by aspiration. Cell pellets were lysed in 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 0.025 M Tris-HCl, pH 7.5, containing Complete Mini Protease inhibitor cocktail (Roche). Extracts were
25 resolved by SDS-PAGE on a 7.5% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose paper using an iBlot Gel transfer system (Invitrogen). The released Notch1^{ICD} molecules initiating at a Valine residue are detected with anti-Notch1^{ICD} and, as a loading control, anti-beta-actin using standard western blot procedures. Densitometric analysis was performed on films that were scanned with a BioRad
30 GS-800 Calibrated Densitometer and analyzed with Quantity One version 4.6.9 software (BioRad). Notch1^{ICD} levels were normalized to beta-actin in each sample and then compared to the untreated control.

As shown in **FIG. 19**, treatment of HBP-ALL cells with increasing concentrations of rat 438-mIgG1 and humanized 438 VH1.1/VL1.8 significantly

inhibited constitutive Notch1 activation, as indicated by the levels of released Notch1^{ICD} detected. Thus, mutation of leucine to proline at position 1575 did not affect the ability of rat 438-mIgG1 and humanized 438 VH1.1/VL1.8 antibodies to inhibit Notch1 activation. This is consistent with **Table 14** demonstrating that the rat
 5 438 antibody did not interact with the amino acid at position 1575 in the wild-type NRR-antibody co-crystal structure.

As shown in **FIG. 20** and **Table 22**, treatment of T-ALL cell lines HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4 and DND-41 cells with increasing concentrations of rat 438-mIgG1, rat 351-mIgG1 and A2 inhibited Notch1 activation in a dose
 10 dependent manner, as indicated by the decreased detection of released Notch1^{ICD} by western blot and densitometric analysis. In contrast, treatment of Jurkat cells with increasing concentrations of rat 351-mIgG1 and A2 failed to inhibit Notch1 activation, as indicated by the detection of released Notch1^{ICD} by western blot analysis. As expected, the control anti-E.tenella antibody demonstrated no effect on
 15 the levels of released Notch1^{ICD} in any of the T-ALL cell lines.

Rat 438-mIgG1, rat 351-mIgG1 and A2 antibodies similarly inhibited Notch1 activation and release of the Notch1^{ICD} in certain T-ALL cell lines with class 1 (HPB-ALL cells with L1575P, ALL-SIL cells with L1594P, MOLT-4 cells with L1601P, and DND-41 cells with compound class 1 mutations L1594P/ D1610V) and class 2
 20 (CCRF-CEM cell line with an 12 amino acid insertion at position 1595) NRR mutations, and rat 351-mIgG1 and A2 failed to inhibit cleavage of the Notch1 receptor and release of the Notch1^{ICD} in Jurkat cells with a class 3 JEM mutation. Furthermore, rat 351-mIgG1 demonstrated higher inhibition of Notch1 activation of a mutant Notch1 receptor, as shown in **FIG. 20** and **Table 22**, compared to the
 25 inhibition of Notch1 activation of a native Notch1 receptor by rat 351, as shown in **Fig. 18** and **Table 21**.

Table 22. Densitometric analysis of Notch1^{ICD} levels from the Western blot of **FIG. 20** (n.d = not determined)

	Normalized Notch1 ^{ICD} levels											
	HPB-ALL		ALL-SIL		CCRF-CEM		MOLT-4		DND-41		Jurkat	
Ab, μg/ml	A2	Rat 351- mIgG1	A2	Rat 351- mIgG1	A2	Rat 351- mIgG1	A2	Rat 351- mIgG1	A2	Rat 351- mIgG1	A2	Rat 351- mIgG1
0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

0.001	0.852	0.833	1.565	0.982	1.119	0.982	n.d.	n.d.	0.787	1.020	1.197	1.535
0.01	1.145	0.886	1.310	0.712	1.276	1.038	0.962	1.525	0.840	0.988	1.165	1.435
0.1	0.330	0.156	0.068	0.080	0.424	0.413	0.644	0.751	0.479	0.367	0.983	1.406
1	0.038	0.075	0.033	0.030	0.048	0.043	0.075	0.284	0.199	0.322	1.152	1.078
10	0.041	0.020	0.043	0.019	0.027	0.034	0.043	0.082	0.114	0.219	1.586	1.204

C. Effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies on viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells line having mutant Notch1 receptors

5

The effects of anti-Notch1 antibodies on HBP-ALL cells were further assessed using an MTS cellular viability indicator (Promega, Madison, WI) to determine the percent viable cells after treatment. The MTS reagent was converted into a product that can be measured at an optical density of 490 nanometers (O.D. 490 nm) by metabolically active living, but not dead cells. HBP-ALL cells (1x10E4 cells/well) in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, Pen/Strep/Glutamine were incubated with 0, 0.47, 1.88, 7.5 and 30 µg/ml of humanized 438 VH1.1/VL1.8, rat 438-mIgG1, rat 351-mIgG1 and A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody for 7 days and then assayed with MTS reagent according to manufacturer's instructions.

15 **Table 23** shows the MTS viability assay of anti-Notch1 inhibitory antibody treatments of HPB-ALL cells with increasing concentration of rat 438-mIgG1, rat 351-mIgG1 and A2 antibodies, and control anti-E.tenella antibody. As a result, HBP-ALL cells treated with increasing concentrations of rat 438-mIgG1, 351-mIgG1 and A2 up to 30µg/ml displayed lower levels of the converted MTS reagent at O.D. 490 nm than control anti-E.tenella treatments. This indicates fewer cells were present in the rat 438-mIgG1, rat 351-mIgG1 and A2 treated cells, a result of increased cell death and/or decreased proliferation.

25 **Table 23.** MTS viability assay of HPB-ALL leukemia cells treated with rat 438-mIgG1, rat 351-mIgG1, and A2, and control anti-E.tenella antibodies

O.D. 490nm					
Antibody concentration	0 µg/mL	0.47 µg/mL	1.88 µg/mL	7.5 µg/mL	30 µg/mL
Rat 438-mIgG1	0.361	0.394	0.284	0.180	0.110
Rat 351-mIgG1	0.366	0.267	0.175	0.119	0.082
A2	0.355	0.271	0.167	0.107	0.076
ANTI-E.TENELLA	0.366	0.425	0.440	0.427	0.445

Standard Deviations					
Rat 438-mlgG1	0.003	0.004	0.007	0.019	0.010
Rat 351-mlgG1	0.009	0.015	0.015	0.011	0.006
A2	0.002	0.018	0.004	0.008	0.013
ANTI-E.TENELLA	0.012	0.004	0.056	0.024	0.010

Similar results were observed for humanized 438 VH1.1/VL1.8 as shown in **Table 24**, which illustrates a MTS assay of anti-Notch1 inhibitory antibody treatments of HPB-ALL cells with increasing concentration of humanized 438

- 5 VH1.1/VL1.8, rat 438-mlgG1 and control anti-E.tenella. Thus, in addition to inhibiting Notch1 activation, humanized 438 VH1.1/VL1.8 antibodies also inhibited growth of cancer cells with a mutation in the NRR domain of Notch1, a common feature in T-ALL patients.

- 10 **Table 24.** MTS viability assay of HPB-ALL leukemia cells treated with humanized 438VH1.1/VH1.8, rat 438-mlgG1 and control anti-E.tenella antibodies

O.D. 490nm					
Antibody concentration	0 µg/mL	0.47 µg/mL	1.88 µg/mL	7.5 µg/mL	30 µg/mL
Humanized 438 VH1.1/VL1.8	0.464	0.427	0.306	0.204	0.162
Rat 438-mlgG1	0.456	0.478	0.373	0.259	0.190
ANTI-E.TENELLA	0.457	0.488	0.428	0.524	0.525
Standard Deviations					
Humanized 438 VH1.1/VL1.8	0.016	0.014	0.011	0.009	0.003
Rat 438-mlgG1	0.012	0.038	0.051	0.034	0.004
ANTI-E.TENELLA	0.008	0.003	0.099	0.029	0.013

To demonstrate the *in vitro* activity of mutant rat 351 antibodies, HPB-ALL cells were treated with increasing concentration of either rat 351-mlgG1, rat

15 351(R58Y)-mlgG1, rat 351(R58Y/V60A)-mlgG1, 438 humanized VH1.1/VL1.8, A2 antibodies or control anti-E.tenella antibody. **Table 25** shows a MTS assay of anti-Notch1 inhibitory antibody treatments and their resulting IC₅₀ values. Both rat 351(R58Y)-mlgG1 and rat 351(R58Y/V60A)-mlgG1 antibodies inhibited HPB-ALL growth, but in a manner more similar to humanized 438 VH1.1/VL1.8 than the wild-

20 type rat 351-mlgG1 antibody as determined by their IC₅₀ values. Thus, the Arg58 residue in rat 351-mlgG1 contributed to its potent inhibitory activity against a Notch1 receptor with a mutant NRR.

Table 25. MTS viability assay of HPB-ALL leukemia cells treated with mutant rat 351-mIgG1 antibodies and IC50 (nM) values.

O.D. 490nm							IC50, nM
Antibody concentration	0 μ g/mL	0.0391 μ g/mL	0.1563 μ g/mL	0.625 μ g/mL	2.5 μ g/mL	10 μ g/mL	
Rat 351-mIgG1	0.755	0.726	0.514	0.311	0.235	0.192	1.27
Rat 351-R58Y-mIgG1	0.697	0.715	0.582	0.345	0.236	0.184	2.17
Rat 351 R58Y/V60A-mIgG1	0.697	0.775	0.667	0.363	0.265	0.184	2.49
438 Humanized VH1.1/VL1.8	0.694	0.702	0.601	0.339	0.223	0.198	2.26
A2	0.755	0.706	0.568	0.325	0.204	0.178	1.85
ANTI-E.TENELLA	0.694	0.735	0.758	0.759	0.772	0.774	n.a.
Standard Deviations							
Rat 351-mIgG1	0.017	0.032	0.018	0.014	0.015	0.005	
Rat 351-R58Y	0.020	0.008	0.024	0.012	0.019	0.006	
Rat 351-R58Y/V60A	0.020	0.024	0.025	0.017	0.014	0.007	
438 Humanized VH1.1/VL1.8	0.022	0.006	0.023	0.016	0.014	0.008	
A2	0.017	0.012	0.029	0.010	0.009	0.017	
ANTI-E.TENELLA	0.022	0.023	0.024	0.009	0.034	0.054	

5

Example 9Effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies on *in vivo* growth of human tumor xenografts

10

A. Notch1 and Jagged1 co-immunohistochemistry

The effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies were tested in pre-clinical models with Notch1 expression in both xenografted tumor and host stromal cells in order to maximize their potential efficacy. To identify a pre-clinical model that

15 expresses Notch1 and one of its ligand, Jagged1, immunohistochemistry using anti-Notch1 and anti-Jagged1 antibodies was performed on the 37622A1 non-small cell lung cancer (NSCLC) patient-derived xenograft (PDX), termed hereinafter "37622A1 NSCLC PDX." A tissue fragment from the 37622A1 NSCLC PDX was formalin-fixed and paraffin embedded (FFPE) using standard histological procedures. Five micron

20 FFPE sections were cut, dewaxed and hydrated to distilled water. Antigens were retrieved in pH 6.0 citrate buffer in a pressure cooker. Endogenous peroxidase was blocked with 0.3% H₂O₂ for 15 minutes. Sections were incubated with DAKO

Protein block for 20 minutes. Endogenous biotin was blocked by an avidin/biotin block kit (Vector). A 1:50 dilution of rabbit anti-Notch1 (ab52627; Abcam) was applied to the sections for 1 hour at room temperature. Anti-rabbit IgG-biotin (JacksonImmuno) was applied to the sections for 30 minutes at room temperature.

5 Streptavidin-HRP was added to the sections for 30 minutes at room temperature. DAB was used to develop color for 5 minutes. Sections were heated at 98°C for 10 minutes in pH 6.0 citrate buffer to destroy bound anti-Notch1 primary and anti-rabbit IgG secondary antibodies from the first reaction. Sections were blocked in DAKO Protein block for 20 minutes and incubated with a 1:100 dilution of rabbit anti-Jagged

10 1 antibody (Santa Cruz) for 2 hours at room temperature. An anti-rabbit IgG-HRP polymer (DAKO) was applied for 30 minutes at room temperature. ImmPACT VIP substrate was used to develop color for 7 minutes. Sections were briefly counterstained in Mayer's hematoxylin, dehydrated, cleared and coverslipped.

As shown in **FIG. 21**, the 37622A1 NSCLC PDX had heterogeneous

15 expression of the human Notch1 receptor (left of dashed line) and human Jagged1 ligand (right of dashed line) within clusters of tumor cells (demarcated with a solid line). Nuclear Notch1^{ICD} (arrows) was also detected at the interface of human Notch1 and human Jagged1 tumor cells indicating active Notch1 signaling. Within the mouse stroma, murine Notch1 was also detected in the PDX-associated

20 vasculature, consistent with the previous finding that Notch1 signaling regulates angiogenesis in the murine neonatal retina. The expression pattern of Notch1 and Jagged1 in the 37622A1 NSCLC PDX indicated that it is a relevant model to examine the *in vivo* effects of anti-Notch1 antibodies.

In NSCLC, K-ras is a frequently mutated oncogene that promotes tumor

25 growth. Thus, the K-ras gene from the 37622A1 NSCLC PDX was sequenced to determine if it contained wild-type or mutant K-ras. Genomic DNA was isolated from a fragment of the 37622A1 NSCLC PDX using the PrepGEM Kit according to manufacturer's instructions (ZyGEM, Solana Beach, CA). K-ras DNA sequences were amplified with KOD polymerase (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) using

30 forward and reverse primers. PCR cycling conditions: 1 cycle at 75°C for 15 minutes, 1 cycle at 95°C for 5 minutes, 1 cycle at 96°C for 1 minute, and 35 cycles at 96°C for 15 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 40 seconds, and 1 cycle at 72°C for 1 minute and 20 seconds. Amplified PCR product of 496 basepairs was purified with QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Valencia, CA) and DNA sequencing was

performed with the BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (ABI, Foster City, CA) according to manufacturer's instructions.

As shown in **FIG. 22**, DNA sequence analysis indicated that the 37622A1 NSCLC PDX possesses a glycine to valine (encoded by the DNA sequence GTT) mutation at amino acid 13 (G13V) in the human K-ras gene.

B. *In vivo* growth inhibition studies for NSCLC xenografts

The effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies were examined in immunodeficient mice on the *in vivo* growth of human tumor xenografts that were established from fragments of freshly resected NSCLC tumors obtained in accordance with appropriate consent procedures (Asterand). The 87393A1 NSCLC patient-derived xenografts and 37622A NSCLC patient-derived xenografts (termed hereinafter "87393A1 NSCLC PDX" and "37622A1 NSCLC PDX", respectively) were passaged *in vivo* as fragments from animal to animal in NOD-SCID and nude (Nu/Nu) female mice, respectively.

When the tumors reached a volume of 200 to 400 mm³, they were staged to ensure uniformity of the tumor size among various treatment groups prior to the administration of anti-Notch1 and control anti-E.tenella antibodies. The 37622A1 NSCLC PDX model was dosed i.p. once a week for 3 weeks with 10 mg/kg of rat 438-mlgG1 and A2, and control anti-E.tenella antibody. The 87393A1 NSCLC PDX model is dosed i.p. twice a week for 4 weeks with 20 mg/kg of rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella antibody. Tumors were measured at least once a week and their volume was calculated with the formula: tumor volume (mm³) = 0.5 x (tumor width²)(tumor length). From 8-11 animals, mean tumor volumes ($\pm$ SEM) for each treatment group were calculated and compared to the control-treated.

Table 26 shows the efficacy of rat 438-mlgG1 and A2 antibodies in 37622A1 NSCLC patient derived xenografts with G13V mutation in K-ras compared to control anti-E.tenella antibody. Growth inhibition of 37622A1 PDXs by rat 438-mlgG1 indicates that NSCLCs with activated Notch1 and/or mutations in the K-ras oncogene might be sensitive to Notch1 pathway inhibitors.

Table 26. Efficacy of rat 438-mIgG1 and A2 antibodies in 37622A1 NSCLC patient derived xenografts with G13V mutation in K-ras.

	Control ANTI-E.TENELLA					
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14	Day 16
Tumor Volume (mm ³)	341.5	547.5	901.0	1128.4	1606.3	1860.5
S.E.M.	40.0	67.1	103.2	151.6	231.3	275.8
	Rat 438-mIgG1					
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 8	Day 11	Day 14
Tumor Volume (mm ³)	336.5	584.5	498.4	429.9	502.5	539.2
S.E.M.	44.6	76.4	81.8	87.1	97.3	126.9
	A2					
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 8	Day 11	Day 14
Tumor Volume (mm ³)	344.3	533.7	523.9	428.7	536.2	622.8
S.E.M.	45.6	72.7	72.1	63.0	117.0	147.5

Table 27 shows the efficacy of rat 351-mIgG1 in 87393A1 NSCLC PDX compared to control anti-E.tenella antibody. Treatment with rat 351-mIgG1 resulted in 29% tumor growth inhibition compared to control anti-E.tenella treated tumors at day 28.

Table 27. Efficacy of rat 351-mIgG1 in 87393A1 NSCLC patient derived xenografts.

	Control Anti-E.tenella					
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 20	Day 26	Day 28
Tumor Volume (mm ³)	312.4	456.5	596.8	695.6	880.4	836.6
S.E.M.	7.7	37.4	45.6	33.3	61.1	41.8
	Rat 351-mIgG1					
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 20	Day 26	Day 28
Tumor Volume (mm ³)	275.4	299.5	433.3	466.2	529.5	590.4
S.E.M.	5.1	35.5	57.8	62.2	89.6	93.5

10

To confirm Notch1 activation was inhibited, western blot analysis using the D3B8 antibody (anti-Notch1^{ICD}) was performed on protein extracts generated from xenografts at the end of the study. Xenografts from the rat 438-mIgG1, A2, and control anti-E.tenella treated 37622A1 NSCLC PDX model, and xenografts from the rat 351-mIgG1 and control anti-E.tenella treated 87393A1 NSCLC PDX models were harvested at the end of the study. Tumor tissue was lysed in 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 0.025 M Tris-HCl, pH 7.5,

15

containing Complete Mini Protease inhibitor cocktail (Roche). Extracts were resolved by SDS-PAGE on a 7.5% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose paper using an iBlot Gel transfer system (Invitrogen). Released Notch1^{ICD} molecules initiating at a Valine residue were detected with the D3B8 antibody (anti-Notch1^{ICD}) and total levels of the Notch1 C-terminal domain were detected with D1E11 (anti-Notch1) (Cell Signaling Technologies) using standard western blot procedures. β -Actin is shown as a loading control.

FIG. 23 shows western blot analysis of protein extracts generated from 37622A1 NSCLC PDXs treated with rat 438-mlgG1 and A2. Detection of released Notch1^{ICD} was observed in control anti-E.tenella treated tumors but not in rat 438-mlgG1 treated tumors, indicating inhibition of Notch1 activation. **FIG. 24** shows western blot analysis of protein extracts generated from 87393A1 NSCLC PDXs treated with rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella antibodies. Detection of released Notch1^{ICD} was observed in control anti-E.tenella treated tumors but not in rat 351-mlgG1 treated tumors, indicating inhibition of Notch1 activation.

Donor clinical information from the original 87393A1 NSCLC PDX specimen indicated that the patient's tumor was an invasive poorly differentiated squamous cell carcinoma of the lung. Involucrin is a marker for squamous cell differentiation in lung tumors (Said, J.W., et. al., Laboratory Investigation, 1983, volume 49, 563-568). To determine whether inhibition of Notch1 activation had an effect on 87393A1 NSCLC PDX tumor cell differentiation, involucrin expression was analyzed by immunohistochemistry and western blot analysis. **FIGS. 25 and 26** show involucrin immunohistochemistry and western blot analysis of rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella treated tumors, respectively. Inhibition of Notch1 activation in 87393A1 NSCLC PDX resulted in increased expression levels of involucrin as demonstrated by immunohistochemistry and western blot analysis. Thus, in addition to reducing tumor size, anti-Notch1 treatment also increased tumor cell differentiation.

To determine whether inhibition of Notch1 activation alone effected body weight, mice were weighed during *in vivo* efficacy studies. **Table 28** shows that the average mouse body weights (minus tumor weights) of rat 351-mlgG and control anti-E.tenella antibody treated groups over the course of the study were not significantly different in the 87393A1 NSCLC PDXs.

Table 28. Average mouse body weights (minus tumor weights) in 87393A1 NSCLC PDXs after treatment with rat 351-mIgG1.

Average Mouse Body Weights in grams (minus tumor weights)					
Antibody	Day 0	Day 7	Day 14	Day 20	Day 26
Control Anti-E.tenella	23.9	23.1	23.4	23.3	22.9
Rat 351-mIgG1	23.4	23.0	23.1	23.3	23.5

C. *In vivo* growth inhibition studies for HPB-ALL Xenografts

- 5 Similar *in vivo* experiments were performed with the mutant Notch1 HPB-ALL cell line as performed with the 37622A1 NSCLC PDX and 87393A1 NSCLC PDX described above. To generate xenografts, nude female mice (Nu/Nu) were implanted subcutaneously with 8×10^6 HPB-ALL cells in 50% Matrigel (BD Biosciences). When the tumors reached a volume of 200 to 400 mm³, the tumors
10 were staged to ensure uniformity of the tumor mass among various treatment groups prior to the administration of anti-Notch1 and control D16A antibodies. The HPB-ALL model was dosed s.c. at 20 mg/kg of rat 438-mIgG1, 351-mIgG1, A2 or D16A antibody, 2 times a week for 2 weeks. Tumors were measured at least once a week and their volume was calculated with the formula: tumor volume (mm³) = 0.5 x
15 (tumor width²)(tumor length). From 8-11 animals, mean tumor masses ($\pm$ SEM) for each treatment group were calculated and compared to the control-treated.

- Table 29** shows the efficacy of rat 438-mIgG1, rat 351-mIgG1 and A2 antibodies in HPB-ALL xenografts with L1575P mutation in Notch1 NRR. The data demonstrates that treatment with rat 438-mIgG1 and treatment rat 351-mIgG1 both
20 inhibited *in vivo* growth of HPB-ALL cells compared to control D16A antibody, thus slowing tumor growth.

Table 29. Efficacy of rat 351-mIgG1, rat 438-mIgG1 and A2 antibodies in HPB-ALL xenografts with L1575P mutation in Notch1 NRR.

	Control D16A					
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 8	Day 11	Day 14
Tumor Volume (mm ³)	175.3	201.9	261.2	522.0	735.9	1003.4
S.E.M.	6.4	4.4	11.4	44.1	82.3	162.2
	Rat 351-mIgG1					
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 8	Day 11	Day 14
Tumor Volume (mm ³)	166.1	198.6	244.1	267.0	231.0	251.0

S.E.M.	8.3	5.5	12.0	21.6	21.3	36.2
Rat 438-mIgG1						
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 8	Day 11	Day 14
Tumor Volume (mm ³)	165.1	194.7	225.0	244.3	176.9	179.2
S.E.M.	4.9	5.0	7.3	25.6	21.6	25.9
A2						
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 8	Day 11	Day 14
Tumor Volume (mm ³)	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. *In vivo* growth inhibition studies for Calu-6 NSCLC Xenografts

Similar experiments were performed with the Calu-6 NSCLC cell line as performed with the HPB-ALL cells above for *in vivo* studies. Calu-6 xenografts were initially established in nude female mice (Nu/Nu) from 2×10^6 *in vitro* cultured cells in 50% Matrigel (BD Biosciences) and then serially passaged *in vivo* as tumor fragments from animal to animal. When the tumors reached the volume of 200 to 400 mm³, the tumors were staged to ensure uniformity of the tumor size among various treatment groups prior to the administration of anti-Notch1 and control antibodies. The Calu-6 model was dosed i.p. at 3, 10 and 30 mg/kg of rat 438-mIgG1 or A2, or 10 mg/kg of control anti-E.tenella, 2 times a week for 2 weeks. Tumors were measured at least once a week and their volume was calculated with the formula: volume (mm³) = $0.5 \times (\text{tumor width}^2)(\text{tumor length})$. From 8-11 animals, mean tumor volumes ($\pm$ SEM) for each treatment group were calculated and compared to the control-treated.

The Calu-6 model was chosen because it was previously demonstrated to respond to Notch pathway inhibitors such as anti-DLL4 (Ridgeway et al., Nature 444:1083-1087, 2006) and A2 antibodies. **Table 30** shows the efficacy of rat 438-mIgG1 and A2 in Calu-6 lung cancer model. Treatment with 3 mg/kg, 10 mg/kg and 30 mg/kg of the rat 438-mIgG1 resulted in a dose-dependent decrease in tumor growth. However, efficient (>50%) growth reduction of Calu-6 xenografts only occurred at the 30 mg/kg dose, which was 3 times higher than the dose required to inhibit the growth of the 37622A1 PDXs to a similar level.

Table 30. Efficacy of rat 438-mIgG1 and A2 in Calu-6 lung cancer model.

	Day 0	Day 6	Day 9	Day 13	Day 16	Day 19
Anti-E.tenella (10 mg/kg)	258±17	491±34	740±64	1156±140	1260±171	1613±222
438 (3 mg/kg)	250±29	362±58	465±88	742±127	888±171	1279±219
438 (10 mg/kg)	263±26	383±40	448±51	566±68	667±87	904±129
438 (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

To determine if inhibition of Notch1 signaling alone effects body weight, mice were weighed during *in vivo* efficacy studies. **Table 31** shows that the average mouse body weights (minus tumor weights) of rat 438-mIgG1 and A2, and control anti-E.tenella treated groups over the course of the study, were not significantly different

Table 31. Average mouse body weights (minus tumor weights) of rat 438-mIgG1 and A2, and control anti-E.tenella treatments in Calu-6 model (n=10-11).

	Day 6	Day 9	Day 13	Day 16	Day 19
E.tenella (10 mg/kg)	24.6±1.56	25.2±1.42	24.3±1.64	24.7±1.74	24.0±1.77
Rat 438-mIgG1 (3 mg/kg)	24.5±2.18	25.8±1.74	25.8±1.67	26.4±1.60	25.7±1.66
Rat 438-mIgG1 (10 mg/kg)	25.1±2.06	25.1±2.21	24.6±1.88	25.1±1.71	24.5±1.54
Rat 438-mIgG1 (30 mg/kg)	24.7±2.21	25.7±2.10	25.2±2.48	25.8±2.18	25.3±2.23
A2 (3 mg/kg)	24.7±2.39	26.1±2.06	26.1±2.05	27.1±1.99	26.4±1.82
A2 (10 mg/kg)	24.5±1.63	25.2±1.74	25.1±1.86	25.3±1.79	24.7±1.69
A2 (30 mg/kg)	25.8±1.61	26.4±1.54	26.2±1.73	26.8±1.99	26.0±2.07

E. *In vivo* growth inhibition studies for breast cancer xenografts

The effects of humanized 438 VH1.1/VL1.8 was examined on the *in vivo* growth in triple negative breast cancer xenografts models, Sum149 and MDA-MB-231. Athymic female mice (Nu/Nu, 6-8 weeks) were obtained from Charles River Laboratories and housed in specific pathogen-free conditions, according to 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.

Cells for implantation into athymic mice were harvested and pelleted by centrifugation at 450Xg for 5-10 minutes. The cell pellets were washed once and re-suspended in sterile serum-free medium. Tumor cells were supplemented with 50%

Matrigel (BD Biosciences) to facilitate tumor take and growth of selected tumor cells as xenografts. Cells ($2-3 \times 10^6$ in 100 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 compound for each experiment.

- 5 For anti-tumor efficacy, animals bearing tumors of 150-300 mm³ in size were randomly divided into groups that received either control antibody (26H6) or humanized 438 VH1.1/VL1.8 and dosed by s.c. injection weekly. Docetaxel was dosed by i.p. injection weekly. Tumor measurements were obtained every 2-3 days. Tumor volume (mm³) was measured with Vernier calipers and calculated using the
- 10 formula: length (mm) x width (mm) x width (mm) x 0.52, shown in **Tables 32** and **33**.

Table 32. Efficacy of humanized 438 VH1.1/VL1.8 in triple negative breast cancer xenografts model, SUM149.

Mean tumor volume (mm ³)				
Day post implant	Vehicle+ 26H6	Docetaxel, 6 mgk I.P weekly	Humanized 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk SC weekly	Humanized 438 VH1.1/VL1.8 + Docetaxel
36	220	225	214	223
41	266	239	166	181
46	408	282	153	149
49	543	486	150	125
53	529	458	135	104
56	711	587	177	144
60	796	638	179	129
63	937	769	239	187
67	1271	962	244	185
SE				
Day post implant	Vehicle+ 26H6	Docetaxel, 6 mgk I.P weekly	Humanized 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk SC weekly	Humanized 438 VH1.1/VL1.8 + Docetaxel
36	8	6	8	6
41	12	7	6	9
46	21	18	16	12
49	34	45	18	9
53	38	39	17	10
56	45	41	19	14
60	68	44	18	12
63	100	53	23	24
67	125	62	22	26

Table 33. Efficacy of humanized 438 VH1.1/VL1.8 in triple negative breast cancer xenografts model, MDA-MB-231

Mean tumor volume (mm ³)				
Day post implant	vehicle+ 26H6	Docetaxel, 10 mgk I.P weekly	Humanized 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk SC weekly	Humanized 438 VH1.1/VL1.8 + Docetaxel
50	413	431	409	428
52	462	478	510	441
57	697	535	451	339
62	1204	717	466	354
65	1716	1326	694	506
69	2291	1396	768	486
SE				
Day post implant	vehicle+ 26H6	Docetaxel, 10 mgk I.P weekly	Humanized 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk SC weekly	Humanized 438 VH1.1/VL1.8 + Docetaxel
50	33	25	21	21
52	38	30	22	26
57	45	33	25	17
62	62	41	27	30
65	145	109	69	56
69	216	128	73	34

Percent (%) inhibition values were measured on the final day of study for drug-treated compared with vehicle-treated mice and are calculated as $100 - \{1 - [(Treated_{Final\ day} - Treated_{Day\ 1}) / (Control_{Final\ day} - Control_{Day\ 1})]\}$. For all tumor growth inhibition experiments, 8 to 10 mice per dose group were used. A Student's *t* test was used to determine the *P* value. **Table 34** shows the efficacy of humanized 438 VH1.1/VL1.8 in triple negative breast cancer xenografts models.

10

Table 34. Efficacy of humanized 438 VH1.1/VL1.8 and in triple negative breast cancer xenografts models.

Tumor model	Agent	%TGI
Sum149	Vehicle+26H6	0
	Docetaxel, 6 mpk	30
	Humanized 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk	97
	Humanized 438 VH1.1/VL1.8 + Docetaxel	104
MDA-MB-231	Vehicle+26H6	0
	Docetaxel, 10 mpk	49
	Humanized 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk	81
	Humanized 438 VH1.1/VL1.8 + Docetaxel	97

Example 10

Effect of anti-Notch1 inhibitory antibodies on the differentiation and proliferation of intestinal cells

5

Pharmacological and genetic inhibition of Notch signaling converts proliferative progenitor cells within intestinal crypts into secretory goblet cells (van Es et al., Nature 435:959-963, 2005). The effects of anti-Notch1 inhibitory antibodies on the proliferation and differentiation of cells in the mouse intestine were examined on tissues collected from the Calu-6 and 87393A1 NSCLC PDX efficacy studies of Example 9. Immunohistochemistry using Alcian blue stain for mucins (ie, secretory goblet cells) and anti-Ki67 for proliferation was performed on intestinal samples.

10 Mouse small intestines were harvested from the Calu-6 and 87393A1 NSCLC PDX efficacy studies, trimmed longitudinally, formalin fixed and held in 70% ETOH. The tissue was then embedded in paraffin. An Alcian Blue stain was performed for mucosubstances according to manufacturer's instructions. Immunohistochemistry using an anti-Ki67 antibody (SP6, Abcam, Cambridge, MA) was performed on a Dako Auto Stainer (Dako, Carpinteria, CA) to demonstrate cell proliferation according to manufacturer's instructions.

1. Image Capture

Stained tissue sections were scanned on a Nanozoomer Slide Scanner (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) using a 20Xobj setting. Images were scanned and saved into the ndp file format. Virtual images were opened in Aperio Image Scope Software (Aperio Technologies, Vista, CA). Two images from opposite sides of the intestine lumen were captured at 10X virtual magnification and saved as Tiff images.

FIG. 27 shows histochemical identification of secretory goblet cells using Alcian Blue stain on the ileum section of mouse intestines from Calu-6 efficacy study treated with either 10 mg/kg rat 438-mlgG1, A2 or control anti-E.tenella antibody. Representative images of intestinal villi and crypts are shown. Goblet cells are demarcated with arrows, and for simplicity, only 1 cell in each image is highlighted as an example. Although anti-Notch1 antibodies did not cause weight loss during the study, treatment with either rat 438-mlgG1 or A2 induced differentiation of secretory goblet cells as evidenced by increased alcian blue staining in villi as well as in the

crypts. Thus inhibition of Notch1 signaling alone increased goblet cell differentiation, however not to a level that significantly impacted body weight.

2. Image Analysis

Virtual images were opened in Image Pro-Plus Software (Media Cybernetics, Bethesda, MD). A manual outline Area of Interest (AOI) was created that included the intestinal tissue (crypt and villi), but excluded the smooth muscle, artifacts, folds, and debris. A threshold was created to identify Alcian Blue stain area and tissue area. The thresholds were applied to the AOIs and range statistics were exported to an Excel spreadsheet. In Excel, a mean Alcian Blue stain ratio was calculated for each animal from the two collected stain ratios to provide a single calculated Alcian Blue Stain Ratio per animal. A mean Alcian Blue Stain Ratio and standard deviation were created for each group. Statistics were performed using the JMP statistical software (JMP, Cary, NC).

Table 35 shows an image quantitation of Alcian Blue stain ratio of rat 438-mlgG1 and A2, and control anti-E.tenella antibody treated mouse intestines in Calu-6 efficacy study. Compared to anti-E.tenella control at 10 mg/kg, there was a significant increase in the Alcian Blue stain ratio in rat 438-mlgG1 dosed at 10 mg/kg and 30 mg/kg. The quantitative image analysis of alcian blue stain confirms the increased differentiation of goblet cells over a larger region of the ileum in comparison to the region shown in **FIG. 27**.

Table 35 shows an image quantitation of Alcian Blue stain ratio of rat 438-mlgG1 and A2, and control anti-E.tenella antibody treated mouse intestines in Calu-6 efficacy study.

Treatment Group	Alcian Blue Stain Ratio	S.E.M.
ANTI-E.TENELLA, 10mg/kg	2.71	0.23
438, 3mg/kg	3.97	0.59
438, 10mg/kg	7.64	0.79
438, 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

Statistical analysis of pairwise comparisons between the average or mean Alcian Blue stain ratios from each treatment group are shown in **Table 36**. Ratios for

each pair were determined using Student's t test. Positive values show pairs of means that are significantly different. Unlike A2, rat 438-mlgG1 dosed at 3 mg/kg did not induce a significant increase in the Alcian Blue stain ratio compared to control anti-E.tenella antibody. Furthermore, A2 dosed at 10 mg/kg induced a significant increase in the alcian blue stain ratio compared to rat 438-mlgG1 dosed at 10 mg/kg suggesting that rat 438-mlgG1 caused less cellular differentiation in intestinal cells than A2.

Table 36. Statistical analysis of mean comparisons of alcian blues stain.

t	Alpha						
2.03452	0.05						
Abs(Dif)-LSD	A2 10mpk	A2 30mpk	Rat 438-mlgG1 30mpk	Rat 438-mlgG1 10mpk	A2 3mpk	Rat 438-mlgG1 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
Rat 438-mlgG1 30mpk	2.409854	-0.09967	-3.48282	-3.0474	-2.62462	0.619362	2.05001
Rat 438-mlgG1 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
Rat 438-mlgG1 3mpk	6.512037	4.002516	0.619362	-0.14848	-0.23884	-3.81524	-2.39216
Anti E-tenella 10mpk	7.942685	5.433165	2.05001	1.2746	1.191806	-2.39216	-3.48282

10

FIG. 28 shows anti-Ki67 immunohistochemistry on mouse intestinal crypts from Calu-6 efficacy study treated with either 10 mg/kg of rat 438-mlgG1, A2, or control anti-E.tenella antibody. Representative images of Ki67-stained intestinal crypts are shown. Ki67-staining was reduced at the base of the crypts in the rat 438-mlgG1 treated animals, but not the control anti-E.tenella treated animals. Loss of Ki67-stained proliferative crypt cells was consistent with the conversion to post-mitotic goblet cells that was observed by alcian blue staining.

Table 37 shows an image quantitation of Alcian Blue stain ratio of rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella antibody treated mouse intestines in the 87393A1 NSCLC PDX efficacy study. Compared to anti-E.tenella control, there was no significant difference in the Alcian Blue stain ratio in rat 351-mlgG1 treated mice ($p = 0.22$). The quantitative image analysis of Alcian blue stain indicated that rat 351-

20

mlgG1 did not induce goblet cell hyperplasia like other Notch pathway inhibitors. Thus, the inhibition of Notch1 signaling with rat 351-mlgG1 did not increase goblet cell differentiation.

- 5 **Table 37.** Quantitation of Alcian Blue stain ratio of rat 351-mlgG1 and anti-E.tenella treated mouse intestines in a 87393A1 NSCLC PDX efficacy study.

	Rat 351-mlgG1	Anti-E.tenella
Alcian Blue Stain Ratio	3.06	2.53
Standard Deviation	0.61	0.81

- FIG. 29 and Table 38** show anti-Ki67 immunohistochemistry and quantitation of Ki67 stain ratio on mouse intestinal crypts from the 87393A1 NSCLC PDX efficacy study treated with either rat 351-mlgG1 or control anti-E.tenella antibodies. **FIG. 29** shows representative images of Ki67-stained intestinal crypts indicating that Ki67-staining was reduced at the base of the crypts in the rat 351-mlgG1 treated animals, but not in the control anti-E.tenella treated animals.

- Consistent with this observation, **Table 38** shows image quantitation of Ki67 stain ratios of rat 351-mlgG1 and control anti-E.tenella antibody treated mouse intestines. The data indicated that there is a small, but statically significant ($p = 0.023$) decrease in Ki67 stain ratios in rat 351-mlgG1 compared to control anti-E.tenella antibody treatments. The quantitative analysis of Ki67 stain ratios showed a decrease in proliferation of cells at the base of crypts as demonstrated by a reduction in the relative levels of Ki67 staining over a larger region of the ileum in comparison to the region shown in the upper panels of **Fig. 29**. Thus, the inhibition of Notch1 signaling with rat 351-mlgG1 decreased proliferation.

- 25 **Table 38.** Quantitation of Ki67 stain ratio on mouse intestinal crypts from 87393A1 NSCLC PDXs treated with rat 351-mlgG1 and control Anti-E.tenella antibodies.

	Rat 351-mlgG1	Anti-E.tenella
Ki67 Stain Ratio	5.66	7.39
Standard Deviation	0.34	1.47

Example 11

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-Notch1 inhibitory antibody

5 1. Iodination procedure

Iodination was performed using the IODO-BEADS method according to manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL). Briefly, ~ 200 µg of test article were used per 2 mCi of ¹²⁵I-iodine (Perkin-Elmer) and were incubated for 15-25 minutes at ambient temperature with 2 IODO-BEADS and ~200 µL of PBS. The
10 reaction mixture was separated from the IODO-BEADS by filtration (Centricon-10 from Millipore, Billerica, MA).

2. Preparation and characterization of dosing solution

For rat 438-mIgG1, a dosing solution was prepared by mixing unlabeled test
15 article rat 438-mIgG1, a trace amount of ¹²⁵I-labeled test article and a formulation buffer (PBS) for a final protein concentrations of 2 mg/mL to enable a dosing volume of 10 mL/kg dosing in mice. For rat 351-mIgG1, three dosing solutions were prepared by mixing unlabeled test article of rat 351-mIgG1, a trace amount of ¹²⁵I-labeled test article and a formulation buffer (PBS) for a final protein concentrations of
20 2, 0.5 and 2.4 mg/mL to enable a dosing volume of 2.5, 10 and 12.5 mL/kg dosing in mice for group I (5 mg/kg i.v.), II (5 mg/kg i.p.) and III (30 mg/kg i.p.), respectively.

The fraction of radioactivity in a dosing solution accounted for by free iodine ("% free iodine") was determined using trichloroacetic acid (TCA) -precipitation. Dosing solution aliquots (5 µL) were mixed with mouse serum (45 µL) and were
25 counted (in triplicate) for total radioactivity (Model 1480 WIZARD™, Wallac Inc., Gaithersburg, MD or Model 2470 Perkin Elmer, Waltham MA). TCA (50 µL of 20% stock) was added to the samples. Samples were centrifuged at approximately 3000 g for 10 minutes. An aliquot of 50 µL of resultant supernatant was counted for soluble counts per minute (cpm). The fraction of free iodine in the dosing solution
30 was calculated using the formula: $[2 * \text{average soluble elution cpm} / \text{average total elution cpm} * 100\%]$. The specific activity of the dosing solution (µCi/mg) was calculated by the formula: $[\text{average total cpm} - 2 * \text{average soluble cpm}] / [\text{dosing solution concentration (mg/mL)} * \text{dosing solution volume (mL)} * 2,200,000 \text{ cpm}/\mu\text{Ci}]$.

The purity of the dosing solution was also qualitatively analyzed using SDS-PAGE and confirmed as a predominately single band under non-reducing conditions and as double bands under reducing conditions.

5 3. Determination of radioactive equivalent concentrations in serum and tissues

The total radioactivity in serum samples (50 μ L, in duplicates) was determined by gamma counting. An equivalent volume of 20% TCA was added into each serum aliquot and samples were spun at ~12000 rpm for 10 minutes. TCA-soluble radioactivity in 50 μ L supernatant aliquot was determined by gamma-counting. TCA-precipitable radioactivity (cpm) in a given sample ($\text{Total cpm} - 2 \times \text{TCA-soluble cpm}$), the specific activity of the dosing solution (TCA-precipitable cpm per mg of protein), as well as dates of sample (tS) and dosing solution (tD) measurements, were used to calculate the test article concentration in a given sample, using the formula: [average TCA-precipitable cpm/ $\text{EXP}(-0.693/60.2 \times (tS - tD))$]/[specific activity (in cpm/mg)*sample volume (in mL)].

The quantitation of radioactive equivalent tissue concentration (μ g eq./g) of ^{125}I -labeled test article was based on the total radioactivity in tissues and the specific activity of the dosing solution after a correction for half-life of ^{125}I using the formula: [sample cpm/ $\text{EXP}(-0.693/60.2 \times (tS - tD))$]/[specific activity (in cpm/mg) x sample weight (in mg)]. TCA-precipitation for tissue samples was not performed. Tissue to serum concentration ratios (T/S) for tissue sample at a given time-point were calculated using the ratio of radioactive equivalent concentration in tissue (μ g eq./g) to that in serum (μ g eq./mL).

25 4. Pharmacokinetic calculations

Pharmacokinetic calculations were based on mean serum or tissue concentrations in mice. A non-compartmental analysis module (Model 201 and 200 for analysis of serum data after IV and IP administration, respectively) of the pharmacokinetic software package WinNonlin, ver. 5.1 (Pharsight) was used. The area under the serum concentration versus time curve (AUC) was calculated using the linear trapezoidal method. The slope of the apparent terminal phase was estimated by log-linear regression using at least 3 data points and the terminal rate constant (λ) was derived from the slope. $\text{AUC}_{0-\infty}$ was estimated as the sum of the

AUC_{0-t} (where t is the time of the last measurable concentration) and Ct/ λ . The apparent terminal half-life ($t_{1/2}$) was calculated as $0.693/\lambda$.

Table 39 shows the serum and tissue exposures of non-tumor bearing nude mice to rat 438-mIgG1 antibodies that were measured at the indicated time points after a single 5 mg/kg i.p. injection of ¹²⁵Iodine-labeled rat 438-mIgG1 antibody. Highest radioactive equivalent (RE) concentrations and exposure (AUC_{0-INF}) were found in serum at all time points examined, followed by liver, skin, kidney, large intestines, small intestines, lungs and eyes. Radioactivity in tissues declined with time, as shown in **Table 39**. Despite the known expression and essential role of Notch1 signaling in the gastrointestinal tract of mice, rat 438-mIgG1 did not preferentially accumulate in the large or small intestines compared to other tissues tested.

Table 39. Serum and tissue concentrations of ¹²⁵Iodine-labeled rat 438-mIgG1 antibody after a single i.p. injection of 5 mg/kg to nude mice.

	1 hour	3 hours	6 hours	24 hours	72 hours	120 hours	168 hours	240 hours	336 hours
serum	4855±5992	16439±9789	15834±1287	6640±539	2983±886	1618±332	1006±291	690±129	111±147
eyes			832±141	302±22	155±41	142±36	46.0±40.6		
kidneys			2121±375	798±95	486±235	373±166	216±40		87.4±8.8
large intestine			2093±156	514±107	154±46	94.2±16.9	54.9±0.8		
liver			7590±925	1677±225	704±501	541±158	322±59		97.9±61.1
lung			1047±633	227±111	253±149	178±46	124±100		25.3±14.8
skin			2688±429	1688±192	513±30	430±160	171±54		70.3±46.0
small intestine			1855±232	353±78	195±40	114±18	55.1±6.5		16.0±9.6

The ratios of tissue to serum concentrations were calculated and the Mean tissue/serum concentration ratios after a single 5 mg/kg i.p. dose of rat 438-mIgG1 to nude mice are shown in **Table 40**. The tissue to serum concentration ratios remained relatively constant through the time points examined, indicating equilibrium between serum and tissues. The serum concentrations of rat 438-mIgG1 were higher than tissue concentrations, such that T/S ratios were low (<1 in general) and within the typical range observed for a mIgG1.

Table 40. Mean tissue/serum concentration ratios after a single 5 mg/kg i.p. dose of rat 438-mIgG1 to nude mice.

	6 hours	24 hours	72 hours	120 hours	168 hours
Eyes	0.053±0.007	0.046±0.001	0.052±0.004	0.092±0.034	0.056±0.058
Kidneys	0.133±0.016	0.121±0.022	0.158±0.035	0.224±0.053	0.220±0.028
Large intestine	0.133±0.012	0.077±0.010	0.052±0.003	0.059±0.006	0.058±0.020
Liver	0.478±0.023	0.255±0.053	0.212±0.127	0.331±0.040	0.332±0.064
Lung	0.065±0.036	0.034±0.016	0.086±0.044	0.117±0.051	0.123±0.079
Skin	0.172±0.040	0.256±0.045	0.185±0.067	0.269±0.103	0.173±0.033
Small intestine	0.117±0.008	0.053±0.007	0.067±0.007	0.071±0.008	0.057±0.014

After administration of ¹²⁵I-labeled rat 438-mIgG1, C_{max} was calculated to be
 5 16.4 µg eq./mL, with a T_{max} achieved at 3 hr. Elimination t_{1/2} was 58 hrs and
 exposure (AUC_{0-∞}) was 788 µg eq.* hr/mL, as shown in **Table 41**. The half life of
 rat 438-mIgG1 after a single 5 mg/kg i.p. dose is relatively short (~ 2.4 d).

Table 41. Pharmacokinetics parameters of anti-Notch1 inhibitory antibody rat 438-mIgG1 in female nude mice after a single i.p. dose of 5 mg/kg.

C _{max} (ug/mL)	T _{max} (hr)	t _{1/2} (hr)	AUC _{clast} (hr*ug/mL)	AUC _{0-inf} (hr*ug/mL)	AUC _{0-inf} /Dose (hr*kg*ug/mL/mg)	AUC Extrap (%)	MRT (hr)
16.4	3	58	779	788	158	1.2	67

Note: PK parameters were generated from mean plasma concentrations (n=3 per time point)

Serum exposures of rat 351-mIgG1 were measured in non-tumor bearing
 nude mice after a single 5 mg/kg i.v., 5 mg/kg i.p. or 30 mg/kg i.p. injection of ¹²⁵I-
 labeled rat 351-mIgG1 antibody. The observed serum concentration values were
 15 used to calculate multiple pharmacokinetic parameters, as shown in **Table 42** and
Table 43.

Table 42 shows pharmacokinetic parameters after the i.v. administration of 5
 mg/kg of ¹²⁵I-labeled rat 351-mIgG1 to female nude mice. The elimination t_{1/2} and
 systemic clearance of rat 351-mIgG1 were ~3 days (70.2 hrs) and 1.74 mL/hr/kg,
 20 respectively. The volume of distribution at steady state (V_{dss}) was 177 mL/kg. The
 exposure (AUC_{0-INF}) was 2871 µg eq.hr/mL.

Table 42. Pharmacokinetic parameters of ^{125}I -labeled rat 351-mIgG1 in female nude mice following i.v. administration of a single 5 mg/kg dose.

Dose mg/ kg	C ₀ μg eq./mL	AUC _{0-last} μg eq.hr/mL	AUC _{0-∞} μg eq.hr/mL	AUC _{0-∞} /Dose μgeq.*hr/mL /mg/kg	AUC _{%Extrap} %	t _{1/2} hrs	CL mL/hr /kg	Vdss mL/kg
5	50.6	2766	2871	574	3.68	70.2	1.74	177

Table 43 shows pharmacokinetic parameters after the i.p. administration of 5 and 30 mg/kg of ^{125}I -labeled rat 351-mIgG1 to female nude mice. The C_{max} was 30 and 151 μg eq./mL, respectively, and the T_{max} was achieved at 6 hours for both dose groups. Elimination t_{1/2} was 93 and 163 hours (~ 4-7 days) and exposure (AUC_{0-INF}) was 2754 and 24080 μg eq.*hr/mL, following the 5 and 30 mg/kg, respectively. The dose normalized AUC ratio (F) between i.p. and i.v. administration was ~ 1.4, suggesting that absorption after i.p. administration of 30 mg/kg was complete in mice.

Table 43. Pharmacokinetic parameters of ^{125}I -labeled rat 351-mIgG1 antibody in female nude mice following i.p. administration of 5 mg/kg and 30 mg/kg.

Dose mg/ kg	C _{max} μg eq./mL	T _{max} hrs	T _{1/2} hrs	AUC _{0-last} μg eq.*hr/ mL	AUC _{0-∞} μg eq.* hr/ mL	AUC _{0-∞} /Dose μg eq.* hr/ mL/mg/kg	AUC %Extrap %	MRT hrs	F %
5	29.7	6	93.2	2572	2754	551	6.64	117	95.9
30	151	6	163	18687	24080	803	22.4	221	complete

15

Serum and tissue exposures of non-tumor bearing nude mice to rat 351-mIgG1 were measured after a single 5 and 30 mg/kg i.p. injection of ^{125}I -labeled rat 351-mIgG1. For the 5 mg/kg i.p. dose, the highest radioactive equivalent (RE) concentrations and exposure (AUC_{0-INF}) were found in serum at all time points examined, followed by liver, spleen, skin, kidneys, small intestine, large intestine, lung and eyes, as shown in **Table 44**. For the 30 mg/kg i.p. dose, the highest radioactive equivalent (RE) concentrations and exposure (AUC_{0-INF}) were found in serum at all time points examined, followed by liver, skin, spleen, small intestine, lung, kidneys, eyes and large intestine, as shown in **Table 45**. The data shows that rat 351-mIgG1 did not preferentially accumulate in the large or small intestines compared to other tissues tested for both the 5 mg/kg and 30 mg/kg i.p. doses.

25

Table 44. Mean tissue and serum concentrations ($\mu\text{g eq./g tissue}$) of ^{125}I -labeled rat 351-mIgG1 in nude mice following a single i.p. dose of 5 mg/kg (n=3 per time point).

Time, hrs	6	24	72	120	168	240	336
eyes	920	631	510	439	235	162	75
kidneys	2052	1167	1128	1029	304	229	89
L. intestine	1147	545	378	316	131	99	41
liver	12228	3417	1223	1135	501	599	140
lung	990	1294	1264	726	183	464	193
skin	2761	3435	2023	1480	665	430	192
S. intestine	1888	767	459	389	171	144	50
spleen	2897	1411	1189	888	349	323	103
Serum	29664	16894	12303	9014	4724	2858	1359

5 **Table 45.** Mean tissue and serum concentrations ($\mu\text{g eq./g tissue}$) of ^{125}I -labeled rat 351-mIgG1 in nude mice following i.p. administration of 30 mg/kg (n=3 per time point).

Time, hrs	6	24	72	120	168	240	336
Eyes	8451	9733	3733	2183	2534	1899	1223
kidneys	9423	6487	8693	2722	4870	4315	967
L. intestine	5225	3175	2644	1448	1133	968	493
Liver	56856	20363	11979	5497	4843	3614	1456
Lung	10237	7091	2496	1749	2902	3002	1925
Skin	22323	17707	15125	8381	7287	4439	3011
S. intestine	10496	4505	3523	1956	1956	1491	638
Spleen	14353	6805	7346	3314	3454	3135	1111
Serum	150928	101971	80782	53137	46925	35299	22982

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An antibody that binds to Notch1, comprising:
5 a heavy chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and
 a CDR3 region from the heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 71.
2. An antibody that binds to Notch1 comprising:
 a light chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a
10 CDR3 region from the light chain variable region comprising SEQ ID NO: 97.
3. An antibody that binds to Notch1 comprising:
 a heavy chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and
 a CDR3 region from the heavy chain variable region as shown in SEQ ID NO: 71,
15 and
 a light chain variable region having a CDR1 region, a CDR2 region, and a
 CDR3 region from the light chain variable region as shown in SEQ ID NO: 97.
4. The antibody according to any one of claims 1-3, comprising a heavy chain
20 variable region amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO:
 71.
5. The antibody according to claim 4, comprising a heavy chain variable region
 amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 71.
25
6. The antibody according to any one of claims 1-3, comprising a light chain
 variable region amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO:
 97.
- 30 7. The antibody according to claim 6, comprising a light chain variable region amino
 acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 97.
8. The antibody according to any one of claims 1-3, comprising a heavy chain
 amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 111.

9. The antibody according to claim 8, comprising a heavy chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 111.
- 5 10. The antibody according to any one of claims 1-3, comprising a light chain amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 113.
11. The antibody according to claim 10, comprising a light chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 113.
- 10 12. An antibody that binds to Notch1, comprising:
a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 71; and
a light chain variable amino acid sequence that is at least 90% identical to
15 SEQ ID NO: 97.
13. An antibody that binds to Notch1, comprising:
a heavy chain variable region amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 71; and
20 a light chain variable amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 97.
14. An antibody that binds to Notch1, comprising:
a heavy chain amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 111; and
25 a light chain amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 113.
15. An antibody that binds to Notch1, comprising:
a heavy chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 111; and
30 a light chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 113.
16. An antibody that binds to Notch1 and competes for binding to Notch1 with the antibody of claims 1, 2 or 3.

17. An antibody or antigen binding portion thereof, that binds to Notch1, wherein the antibody binds an epitope comprising at least 7 amino acid residues selected from 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, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 and Leu 1718.
18. The antibody according to any one of claims 1-17, wherein said antibody is an IgA, IgD, IgE, IgG, or IgM molecule, or is derived therefrom.
19. The antibody according to claim 18, wherein the antibody is an IgG, having a subclass selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, or is derived therefrom.
20. The antibody according to claim 19, wherein the subclass is derived from IgG1.
21. A nucleic acid that encodes the antibody according to any one of claims 1-20.
22. A nucleic acid comprising the sequence as set forth in SEQ ID NO: 112.
23. A nucleic acid comprising the sequence as set forth in SEQ ID NO: 114.
24. A vector comprising the nucleic acid according to any one of claims 21-23.
25. A host cell comprising the vector of claim 24.
26. A process for producing an antibody, comprising cultivating the host cell of claim 25 and recovering the antibody from the culture media.
27. A host cell that recombinantly produces the antibody according to any one of claims 1-20.
28. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to any one of claims 1-20 and a pharmaceutically acceptable carrier.

29. A method of treating a disorder in a subject in need thereof, comprising administering to said subject the antibody according to any one of claims 1-20, or the pharmaceutical composition of claim 28.
- 5 30. The method of claim 29, wherein said disorder is associated with abnormal activation of Notch1.
31. The method of claim 29 or 30, wherein said disorder is selected from the group consisting of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), non-small cell lung cancer (NSCLC) and breast cancer in a subject in need thereof.
- 10 32. The antibody of any one of claims 1-20 for use in therapy.
33. The use of an antibody of any one of claims 1-20 for the manufacture of a medicament.
- 15 34. The use according to claim 32 or 33, wherein said use is for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), non-small cell lung cancer (NSCLC) and breast cancer in a subject in need thereof.
- 20 35. An antibody that binds to Notch1, comprising:
a heavy chain variable region amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 115; and
a light chain variable amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:
25 129.
36. An antibody that binds to Notch1, comprising:
a heavy chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 149; and
a light chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 151.
- 30 37. An antibody that binds to human Notch1, wherein the antibody binds an epitope comprising at least 8 amino acid residues selected from 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 and Lys 1718.

38. An antibody that demonstrates higher inhibition of Notch1 activation of a mutant
5 Notch1 receptor compared to inhibition of Notch1 activation of a native Notch1 receptor.

39. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to any one of
10 claims 35-38 and a pharmaceutically acceptable carrier.

40. A method of treating a disorder in a subject in need thereof, comprising
administering to said subject the antibody according to any one of claims 35-38,
or the pharmaceutical composition of claim 39.

15 41. The method of claim 40, wherein said disorder is associated with abnormal activation of Notch1.

42. The method of claim 40 or 41, wherein said disorder is selected from the group
consisting of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), non-small cell lung
20 cancer (NSCLC) and breast cancer in a subject in need thereof.

43. The antibody of any one of claims 35-38 for use in therapy.

44. The use of an antibody of any one of claims 35-38 for the manufacture of a
25 medicament.

45. The use according to claim 43 or 44, wherein said use is for the treatment of T-
cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), non-small cell lung cancer (NSCLC)
and breast cancer in a subject in need thereof.

30

1/28

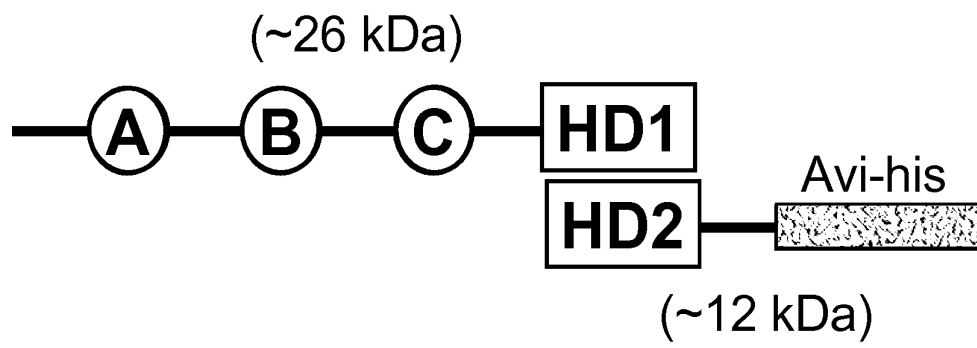
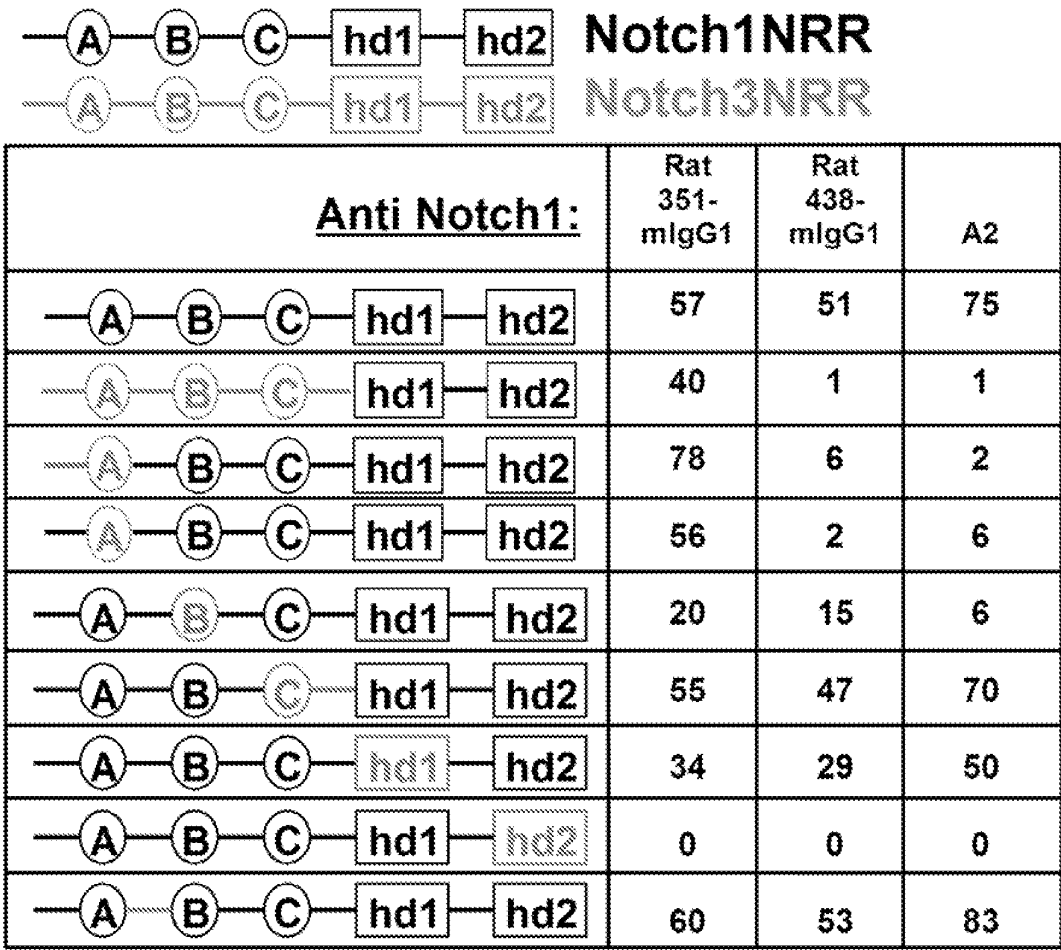
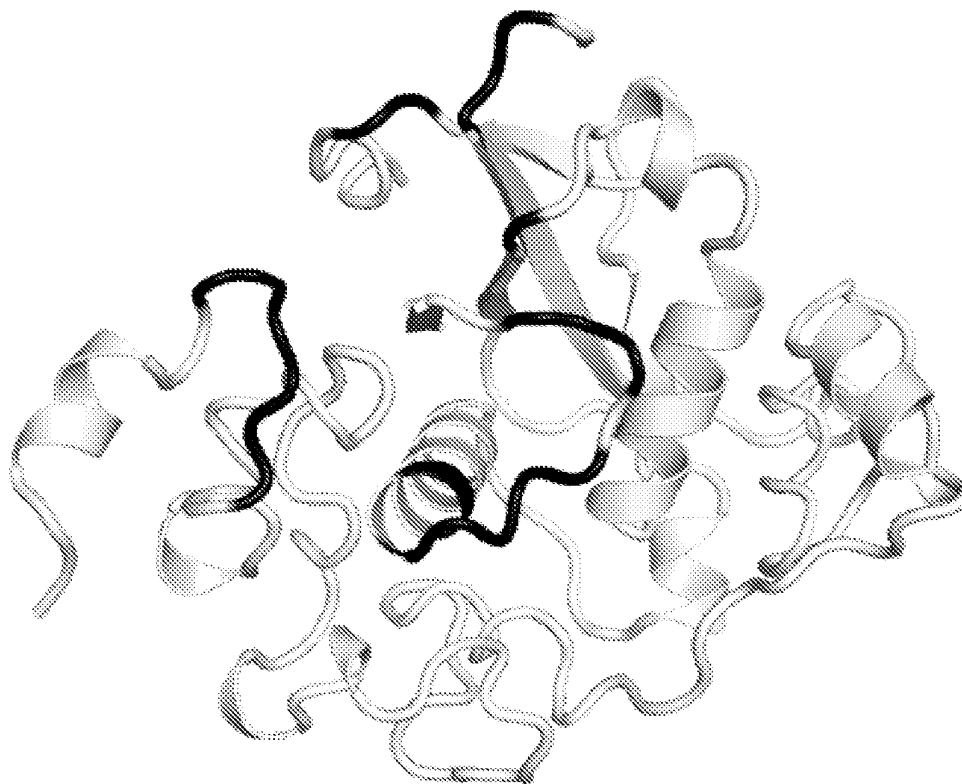
FIG. 1

FIG. 2



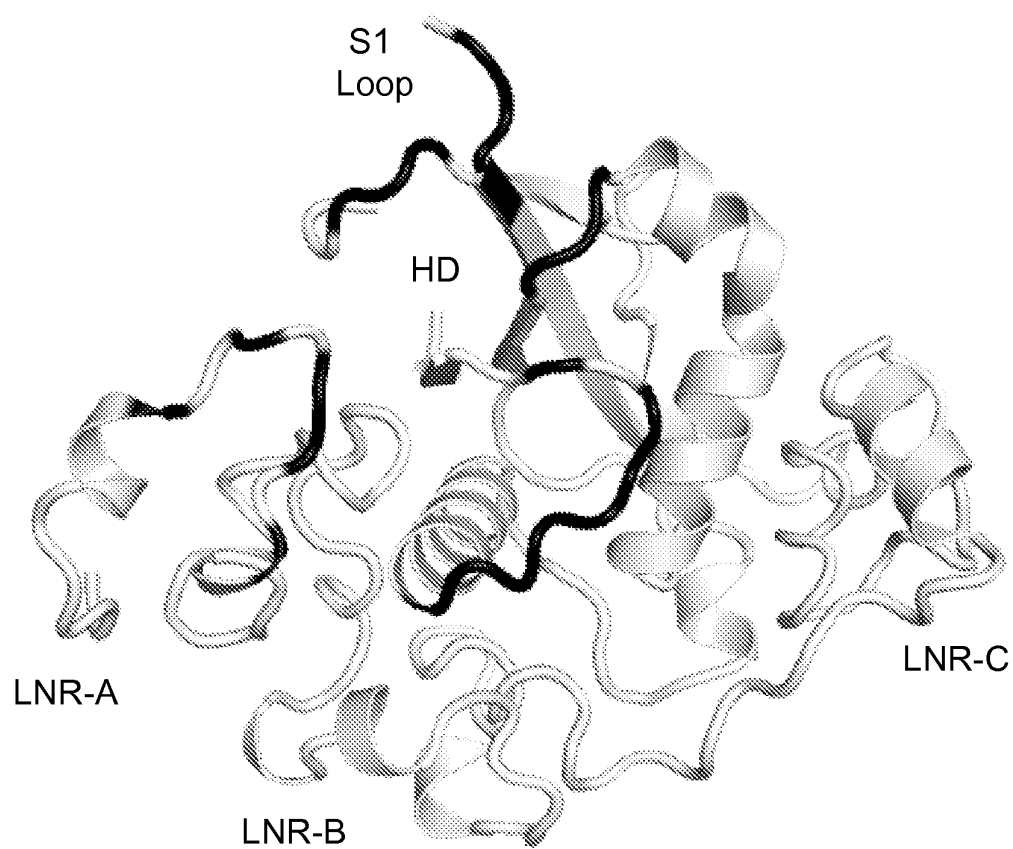
3/28

FIG. 3



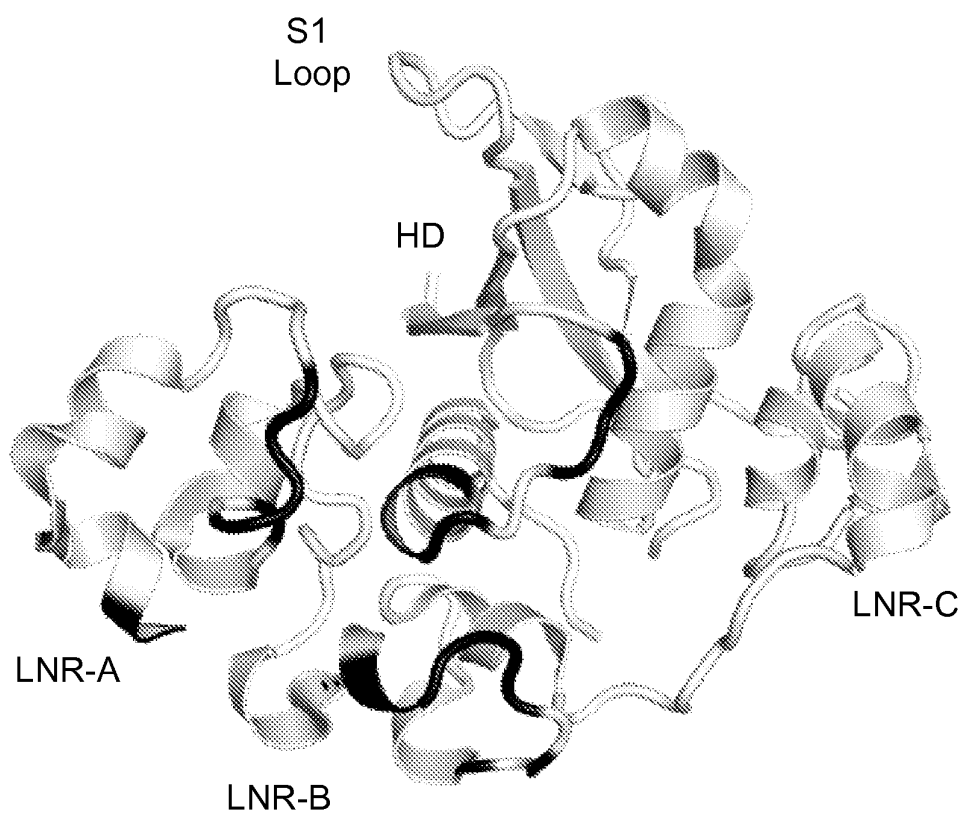
Rat 438 epitope on human Notch1 NRR

4/28

FIG. 4

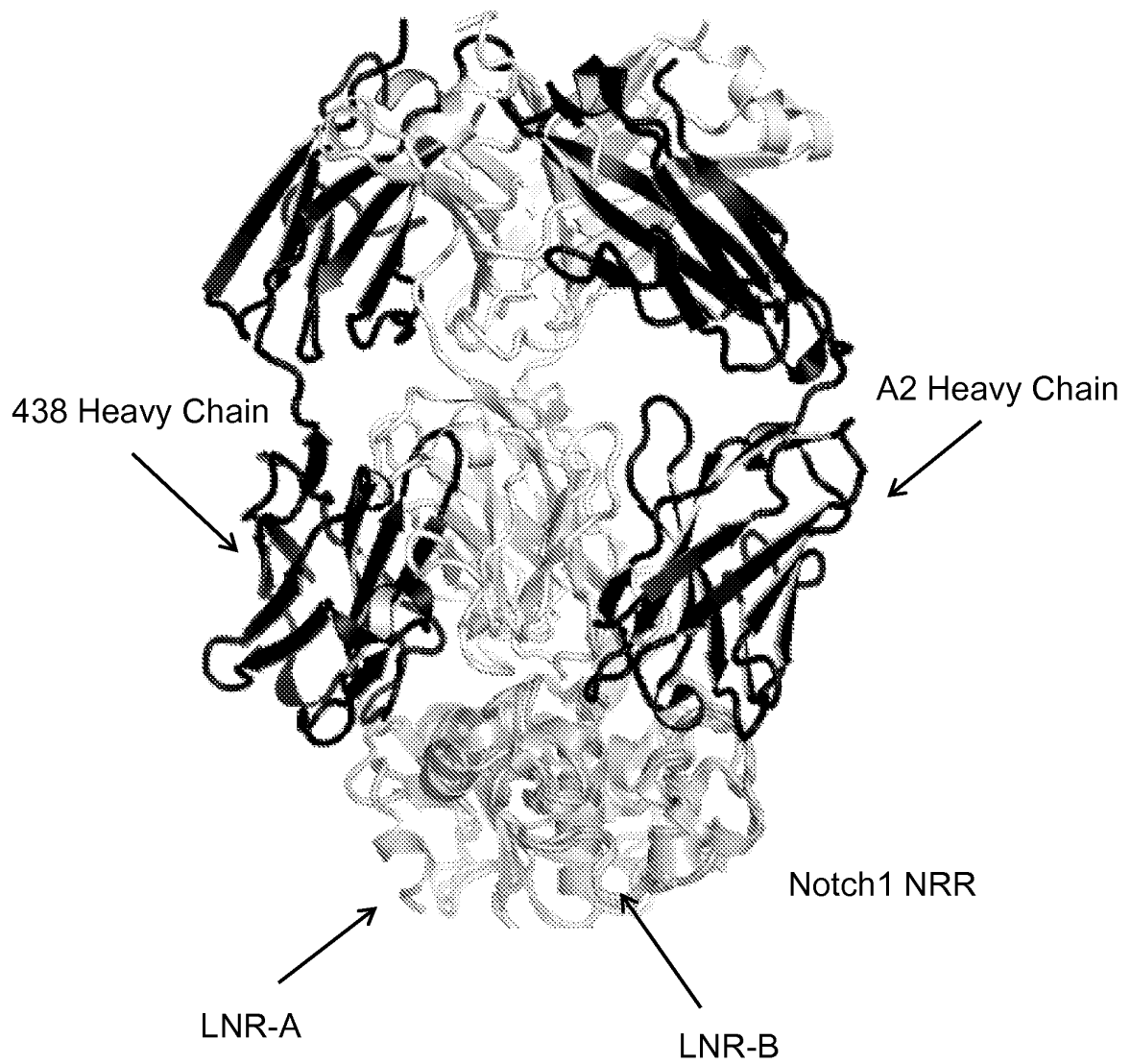
Rat 351 epitope on human Notch1 NRR

5/28

FIG. 5

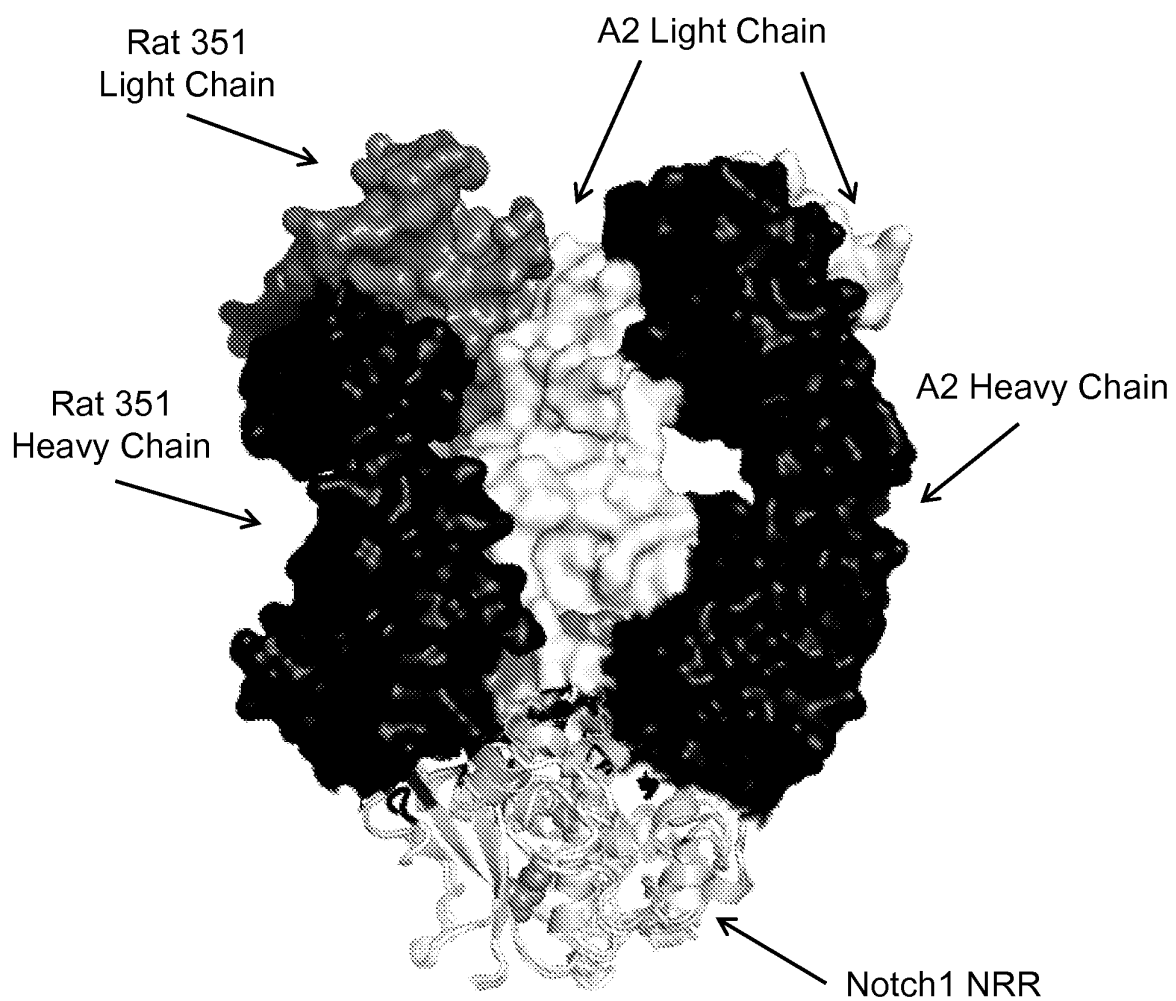
A2 epitope on human Notch1 NRR

6/28

FIG. 6

Superposition of the structures of human
Notch1 NRR bound to rat 438 and A2

7/28

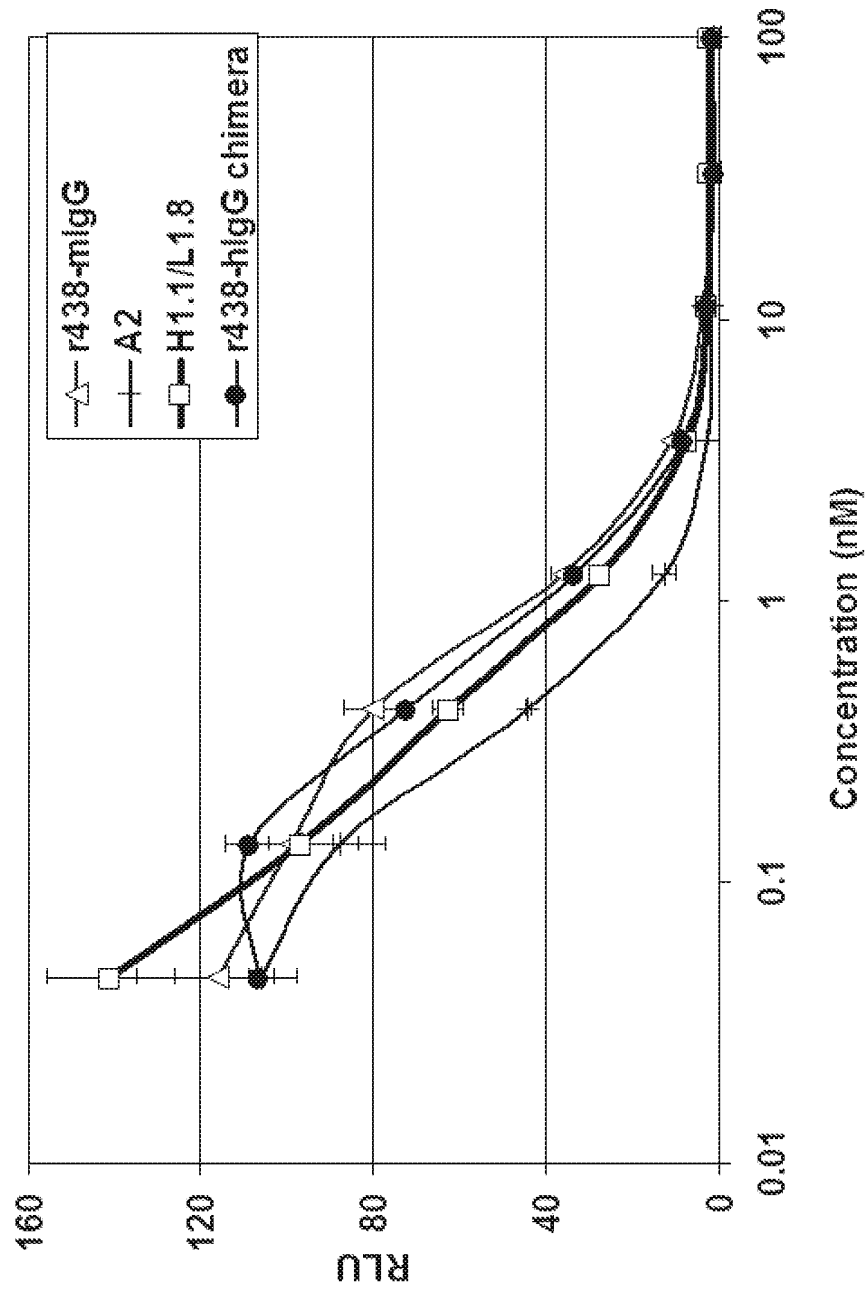
FIG. 7

Superposition of the structures of human Notch1 NRR bound to rat 351 and A2

8/28

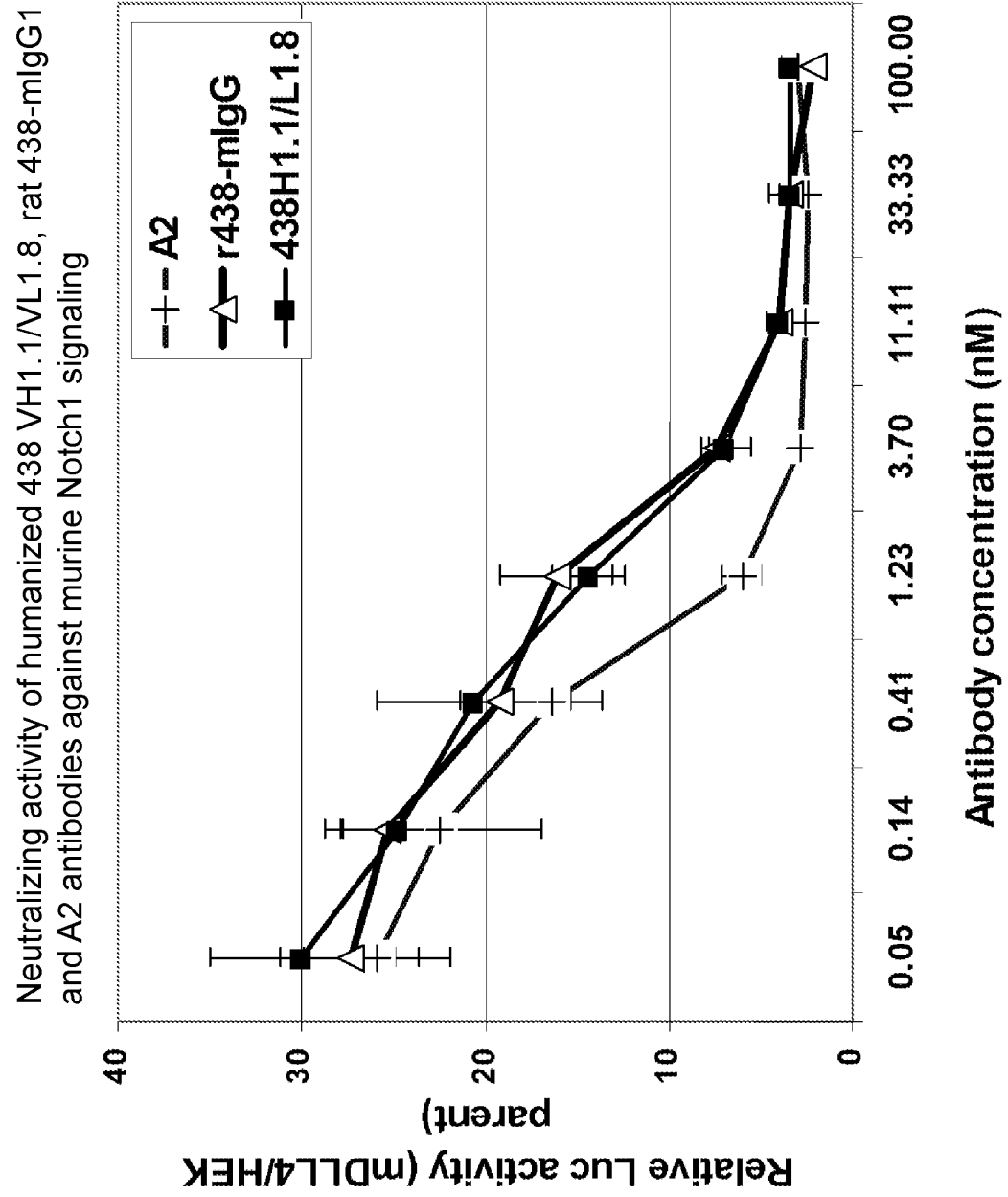
FIG. 8

Neutralizing activity of humanized 438 VH1.1/VL1.8, rat 438-mIgG1 and A2 antibodies against human Notch1 signaling

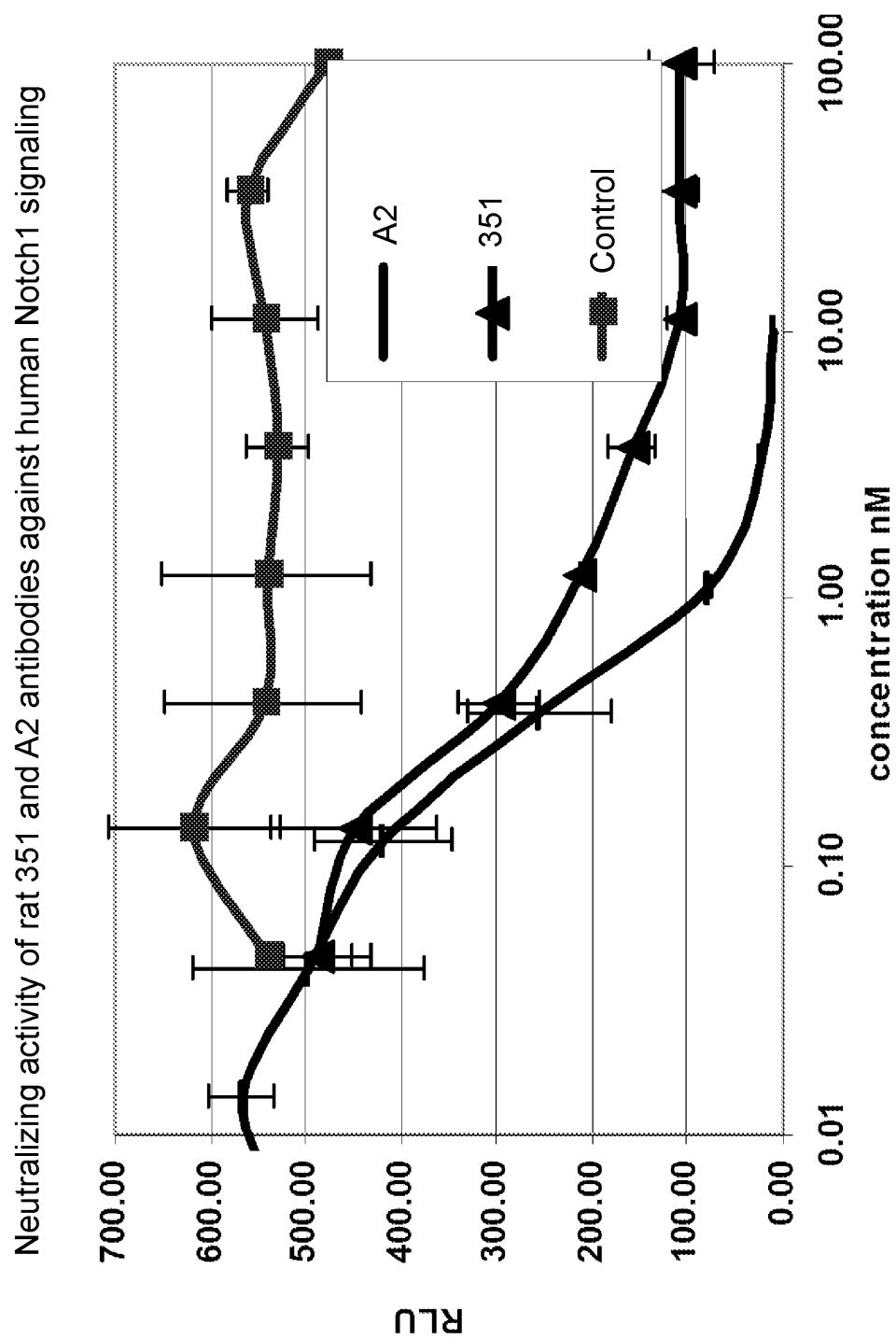


9/28

FIG. 9



10/28

FIG. 10

11/28

Neutralizing activity of rat 351 and A2 antibodies against mouse Notch1 signaling

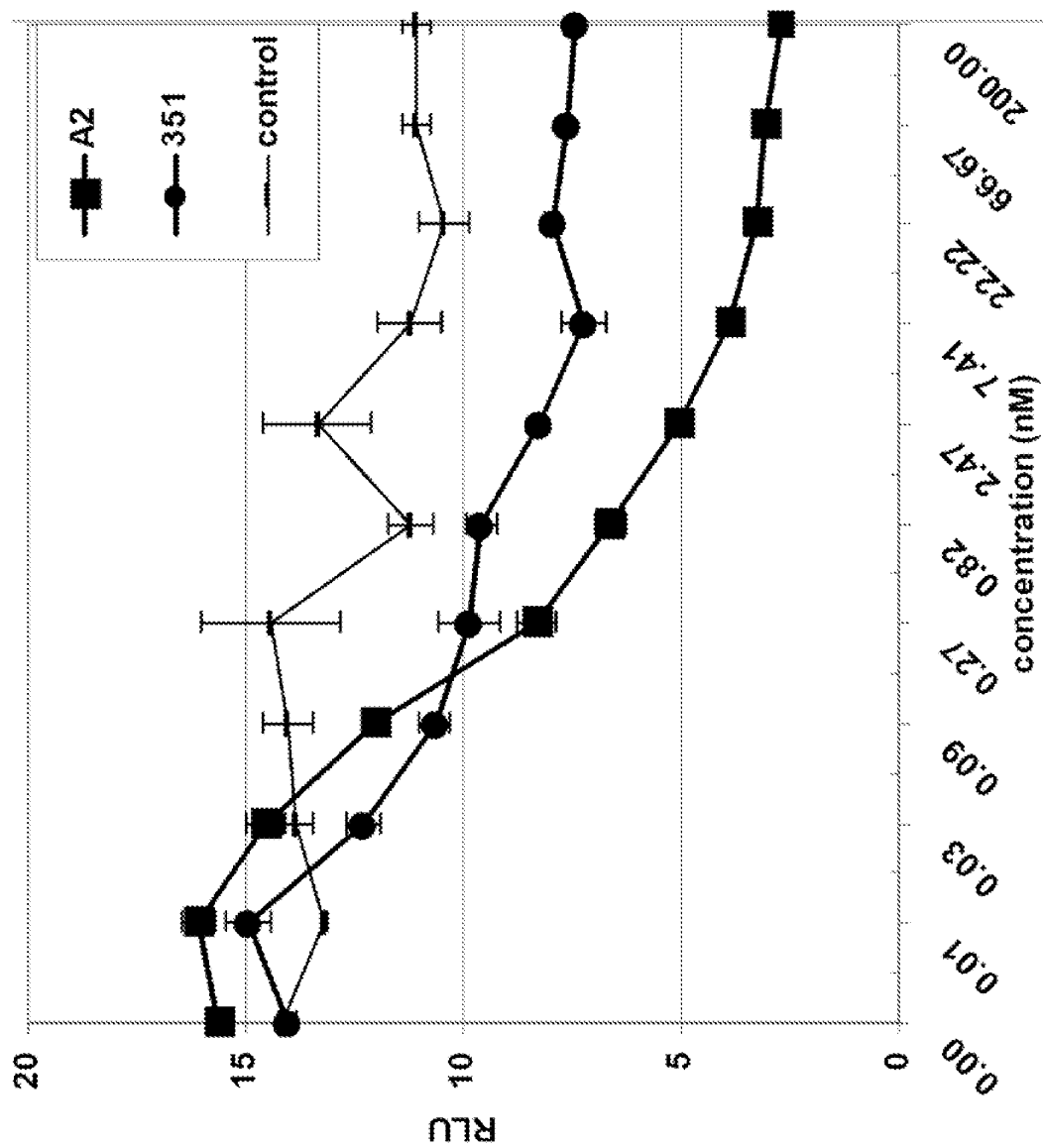
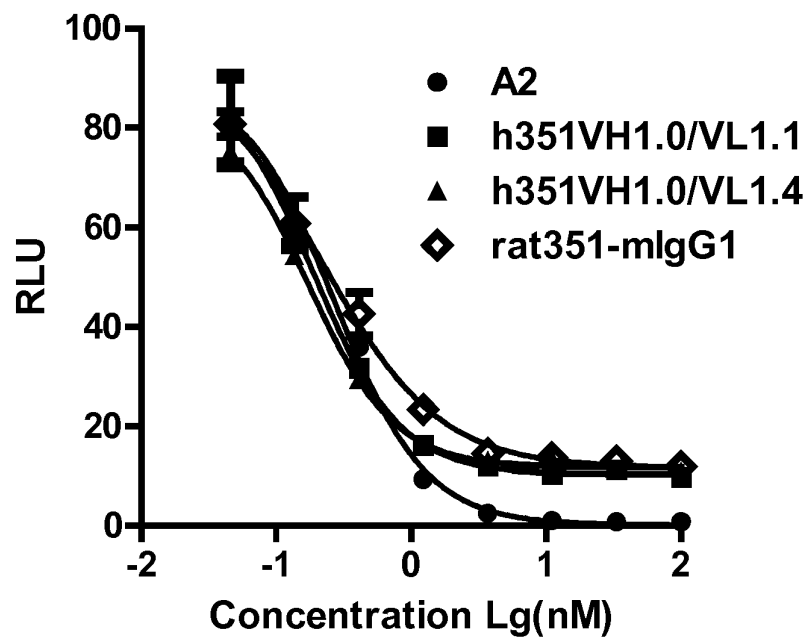


FIG. 11

12/28

FIG. 12

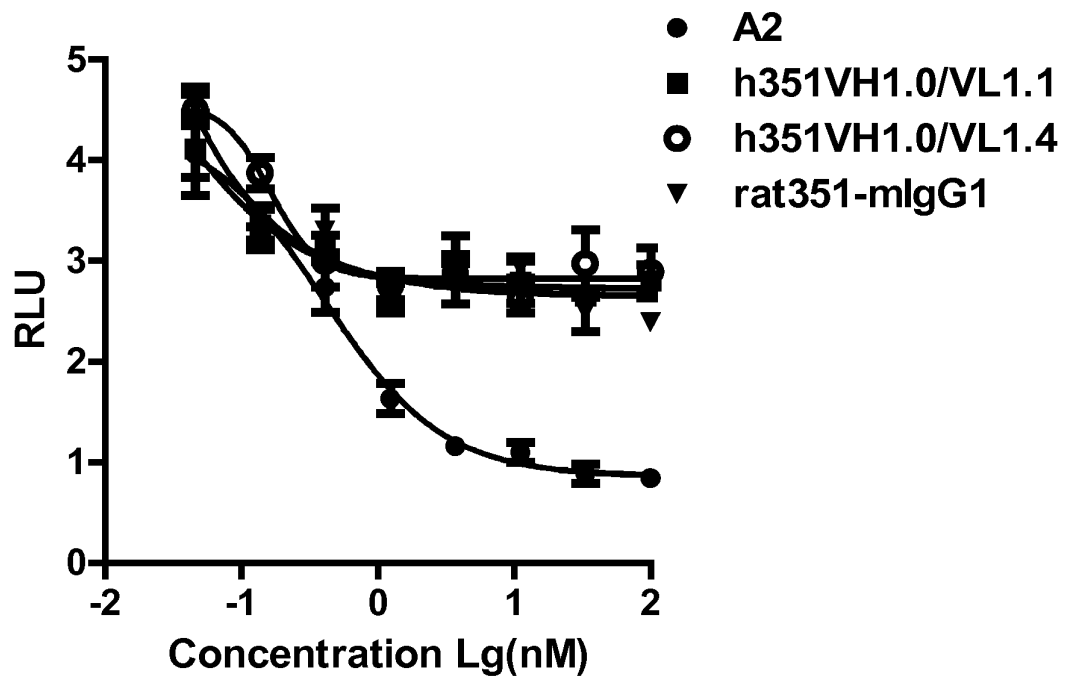
Neutralizing activity of humanized 351 variants,
rat 351-mlgG1 and A2 antibodies against
human Notch1 signaling



13/28

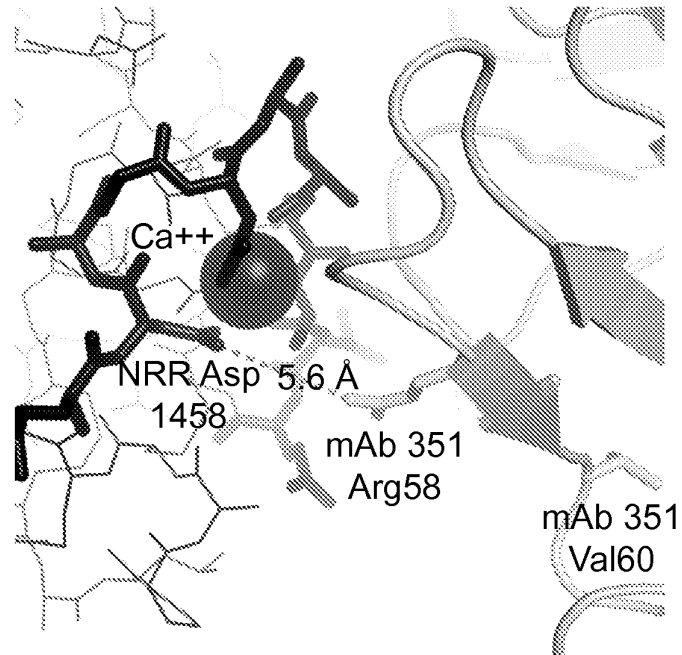
FIG. 13

Neutralizing activity of humanized 351 variants,
rat 351-mIgG1 and A2 antibodies against human
Notch1 signaling

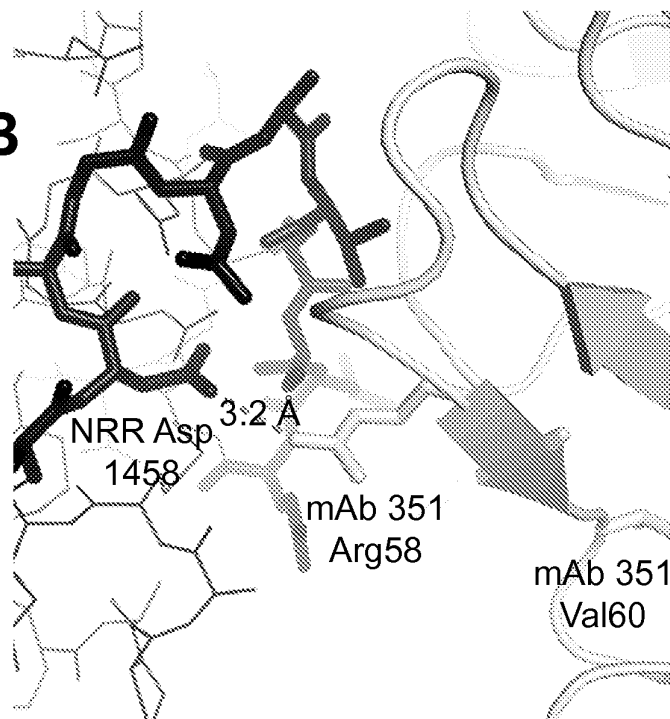


14/28

LNR-A/Heavy Chain Interaction in Complex 1

FIG. 14A

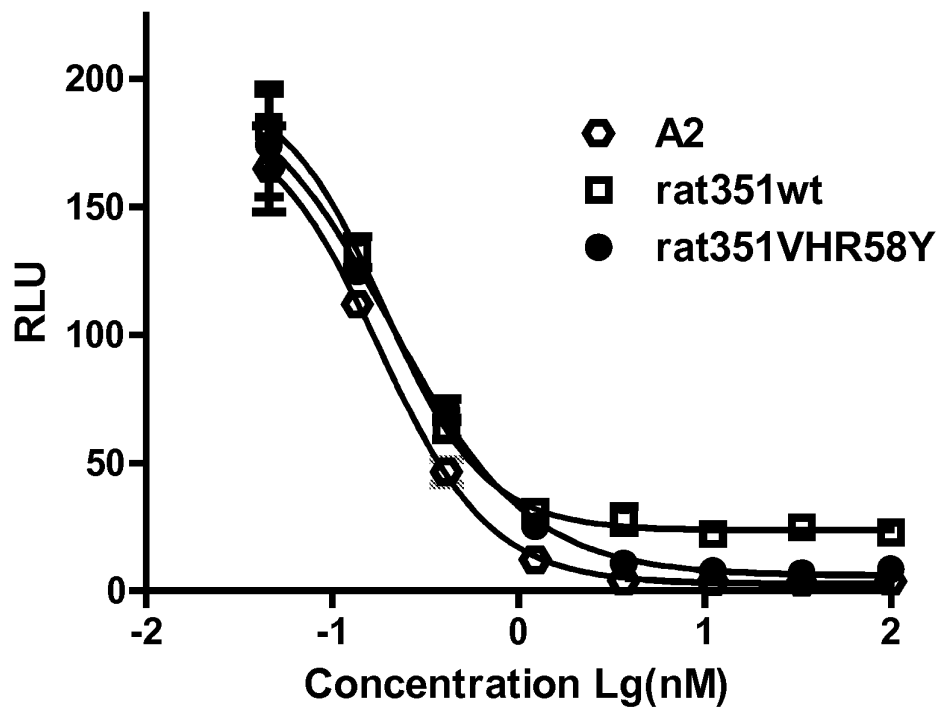
LNR-A/Heavy Chain Interaction in Complex 2

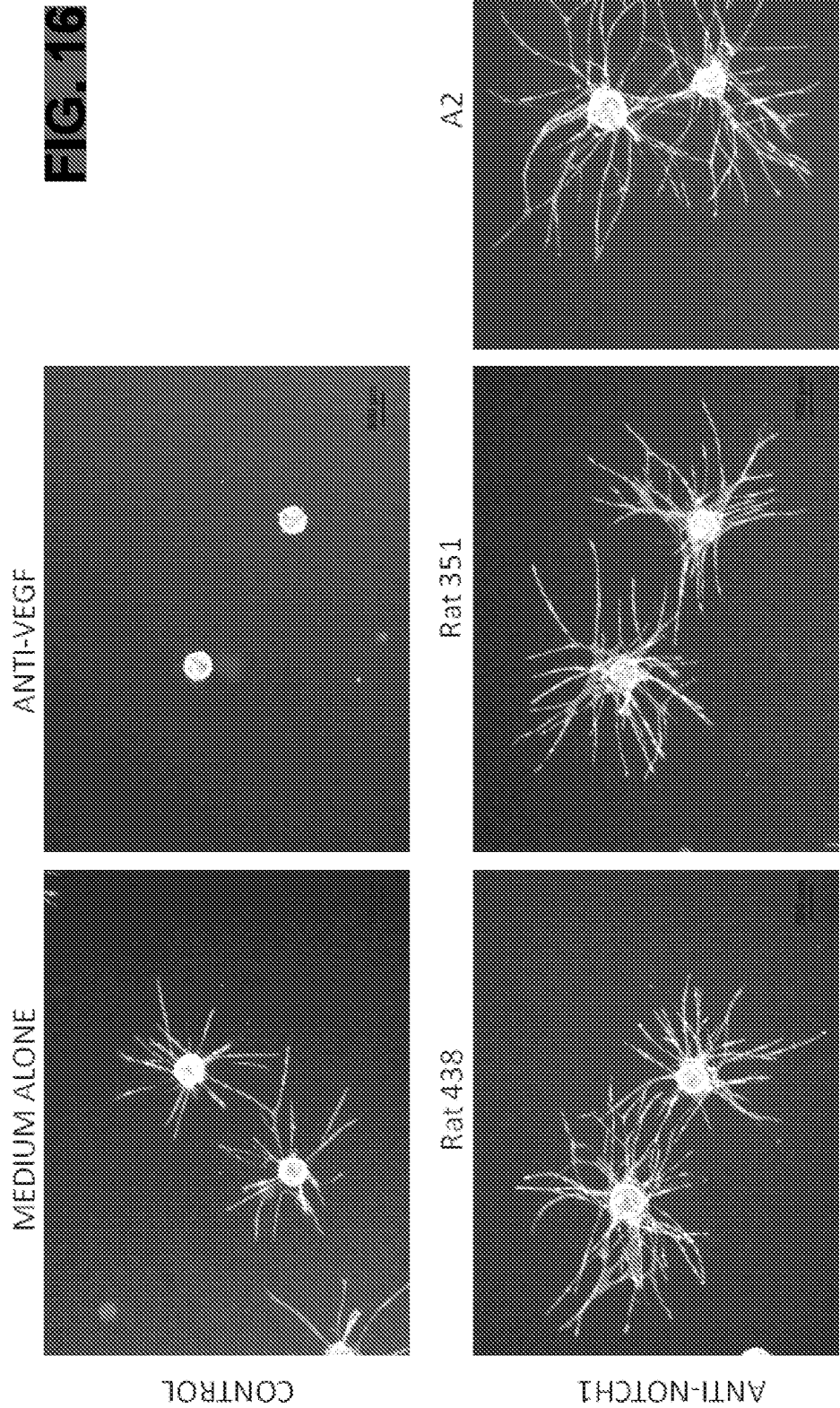
FIG. 14B

15/28

FIG. 15

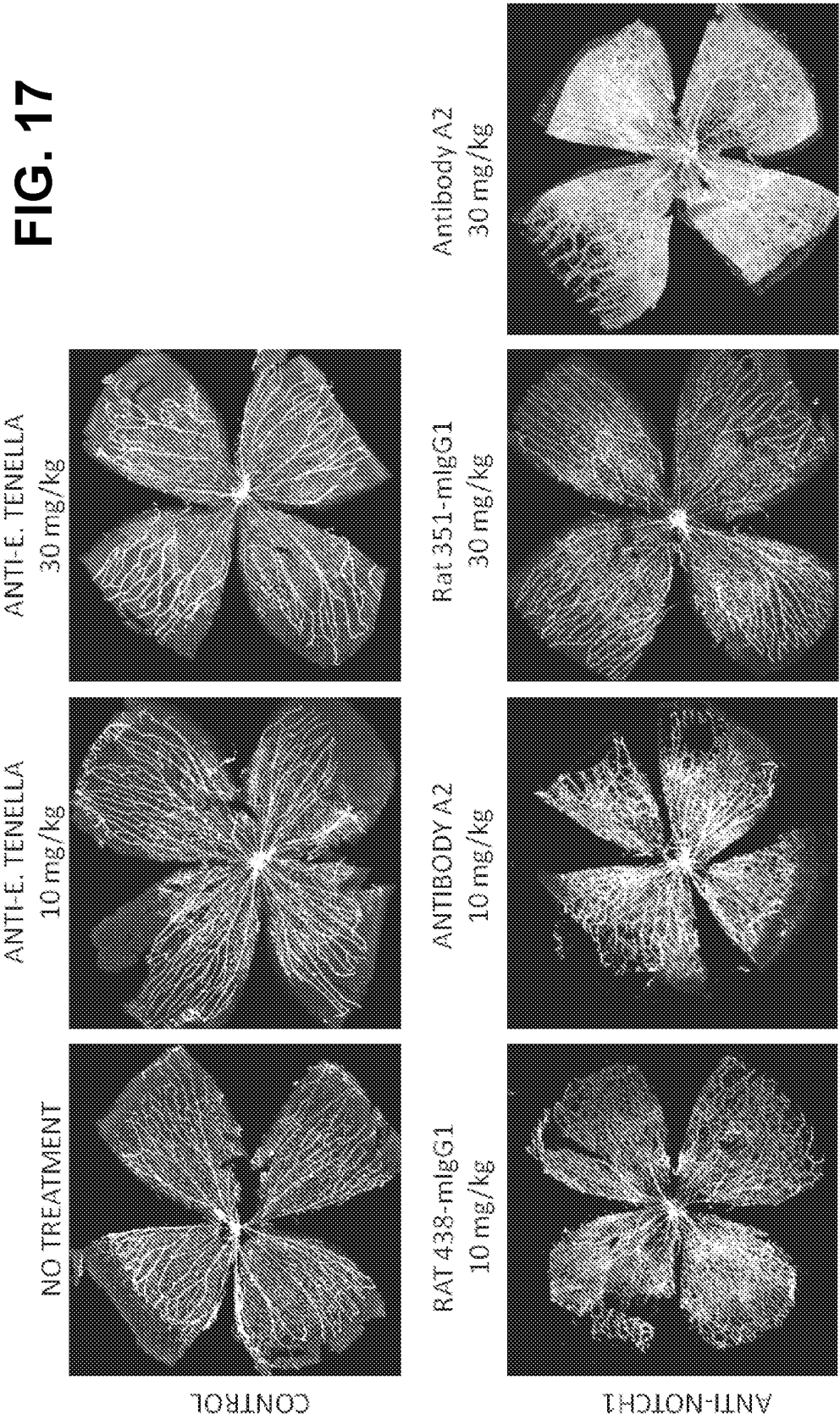
Neutralization activity of rat 351, mutant rat 351
and A2 in co-culture reporter gene assays





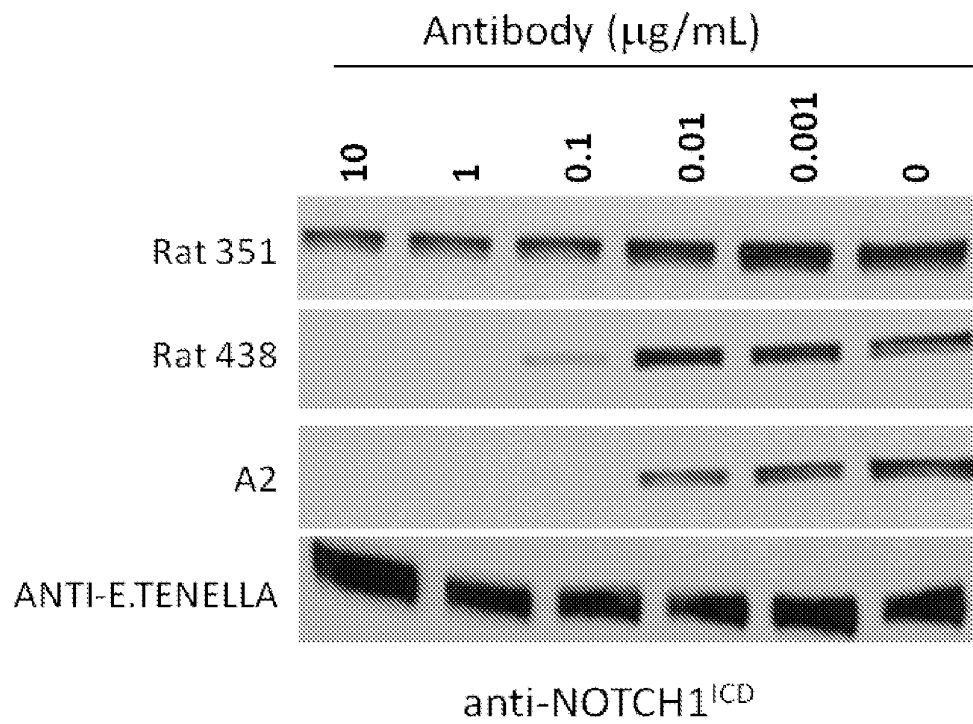
Representative epifluorescent images of CD31-Cy3 immunostaining of in a HUVEC-FGBA using human lung tumor-associated fibroblasts

FIG. 17



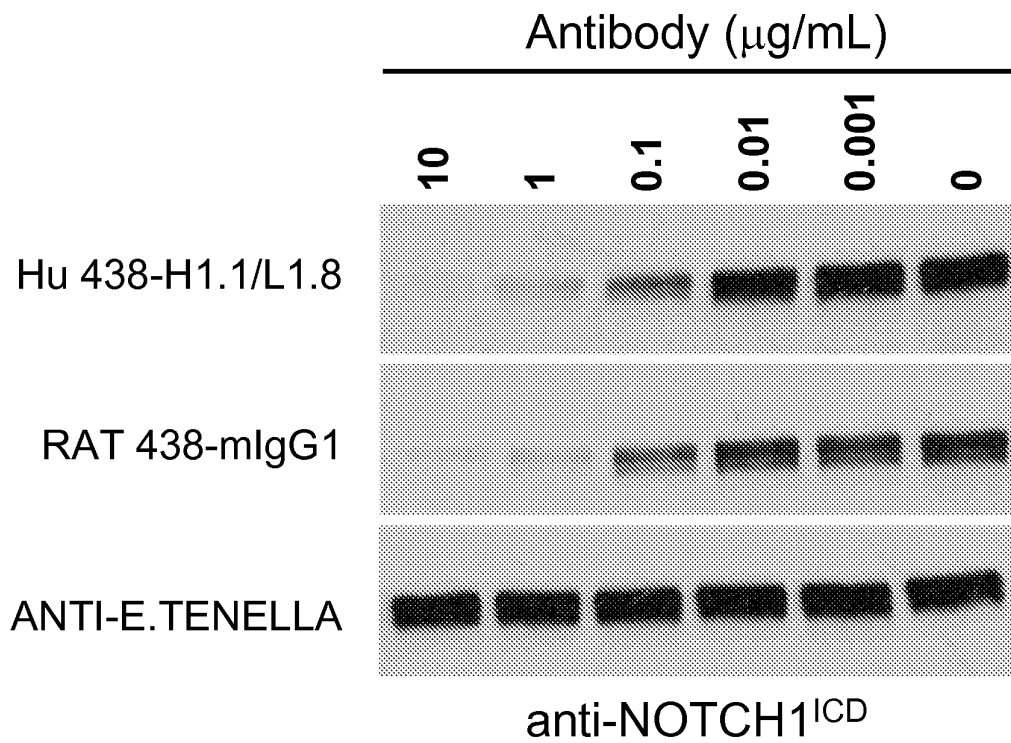
Representative confocal images of Isolectin B4-Alexa488 staining in a mouse retinal model of angiogenesis

18/28

FIG. 18

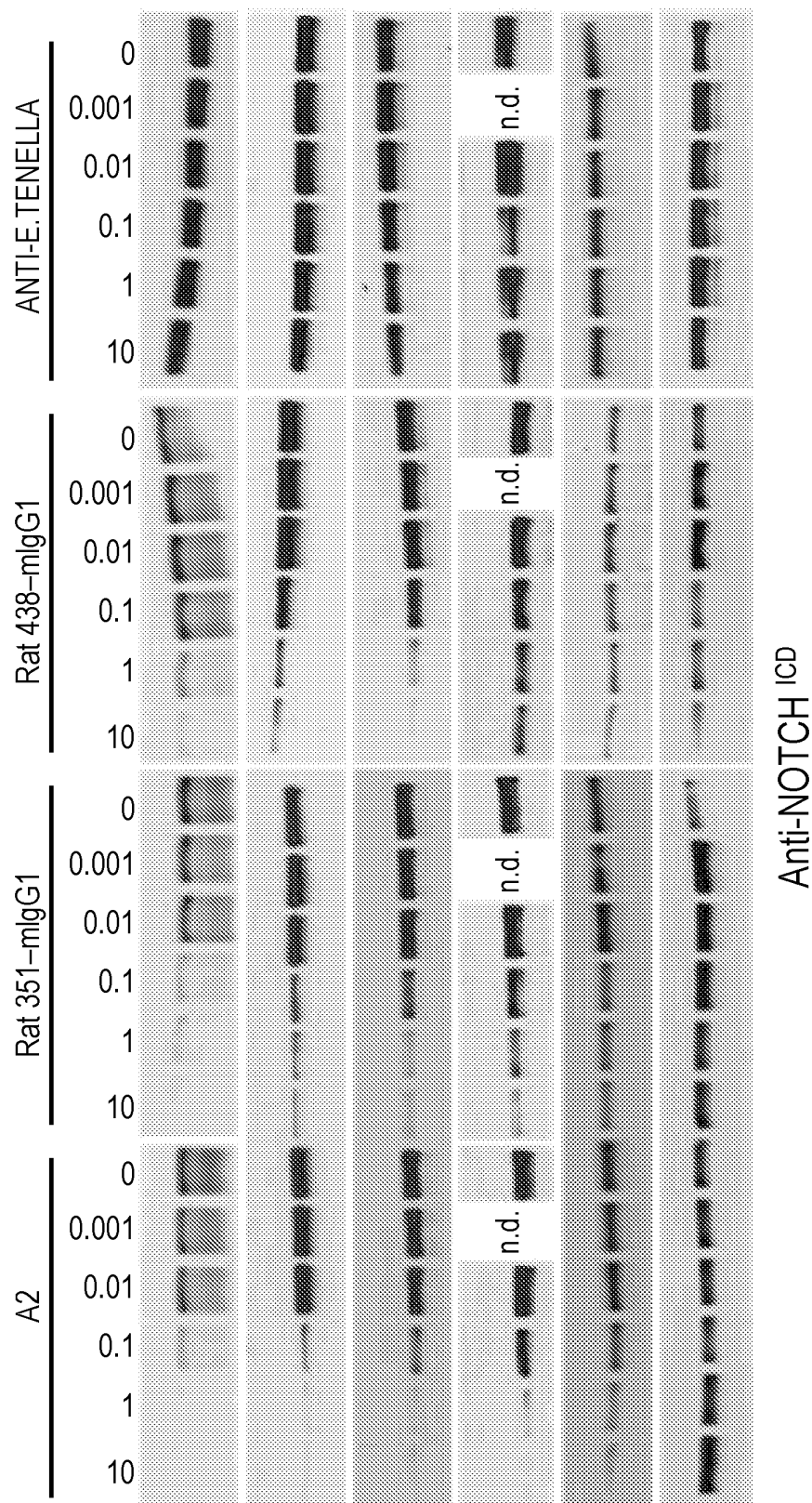
Western blot analysis of protein extracts generated from CCD1076SK human fibroblasts plated on recombinant human DLL4 ligand

19/28

FIG. 19

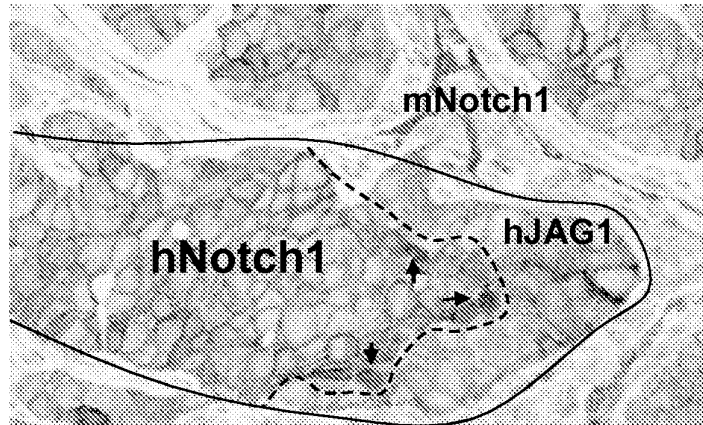
Western blot analysis of protein extracts
generated from HPB-ALL cells

FIG. 20

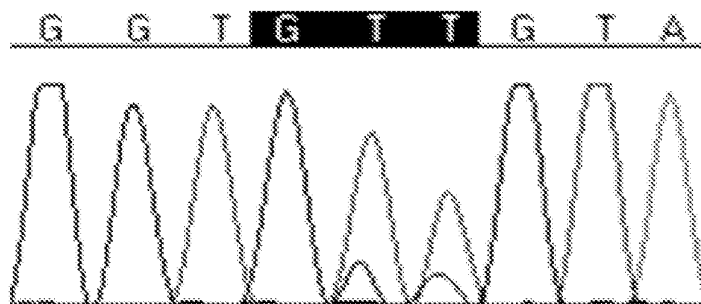


Western blot analysis of protein extracts generated from T-ALL cell lines (n.d. = not determined)

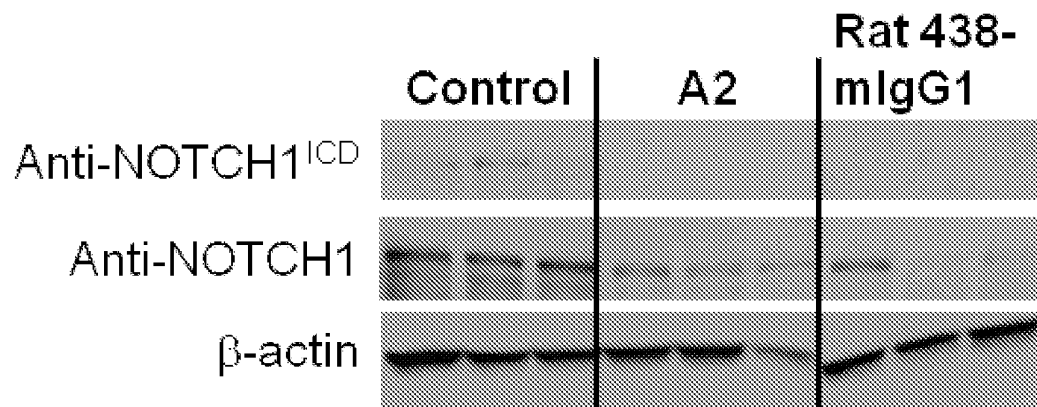
21/28

FIG. 21**FIG. 22**

K-ras G13V mutation

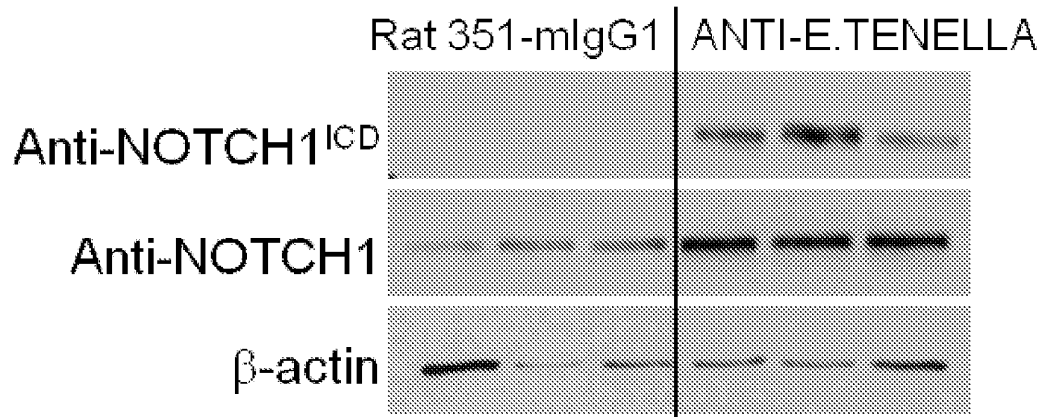


22/28

FIG. 23

Western blot analysis of protein extracts generated in 37622A1 NSCLC patient derived xenografts

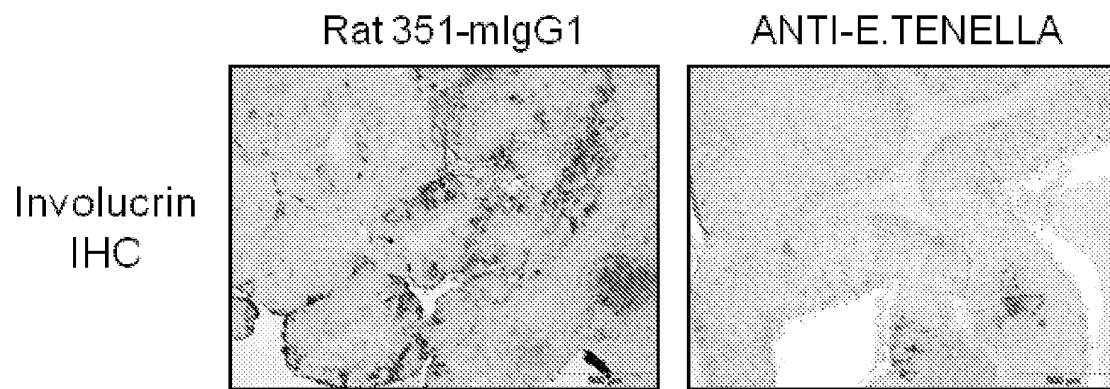
23/28

FIG. 24

Western blot analysis of protein extracts generated in 87393A1 NSCLC patient derived xenografts

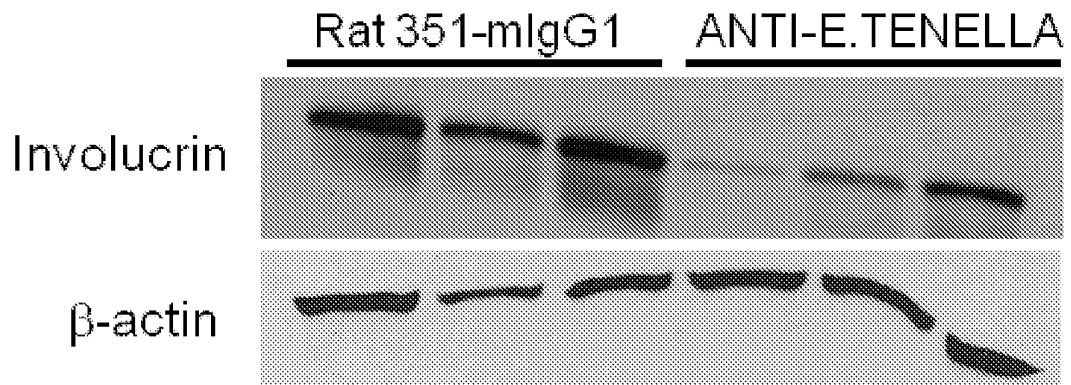
24/28

FIG. 25



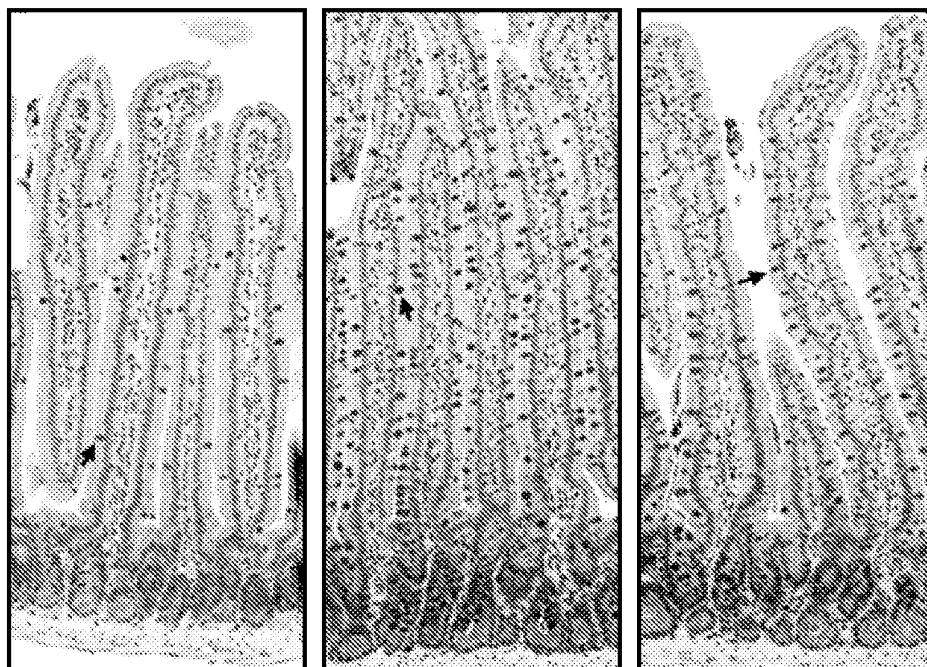
Immunohistochemical detection of involucrin expression
in 87393A1 NSCLC patient derived xenografts

25/28

FIG. 26

Western blot analysis of involucrin expression
in 87393A1 NSCLC patient derived xenografts

26/28

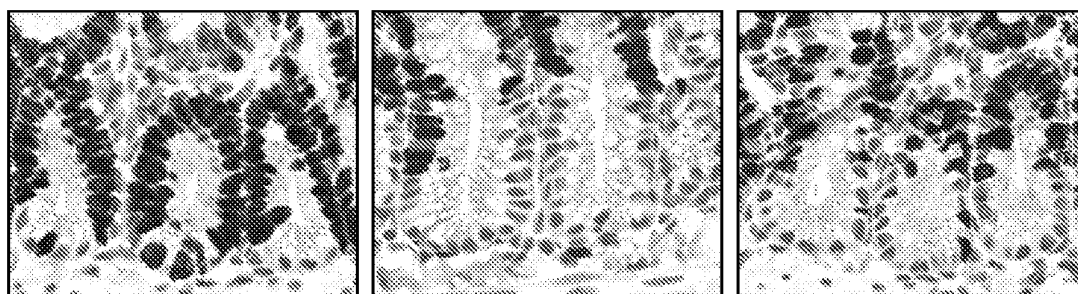
FIG. 27ANTI-
E.TENELLARat 438-
mIgG1

A2

Histochemical identification of secretory goblet cells using
Alcian Blue stain on the ileum section of mouse intestines
from Calu-6 efficacy study

27/28

FIG. 28



ANTI-E.TENELLA

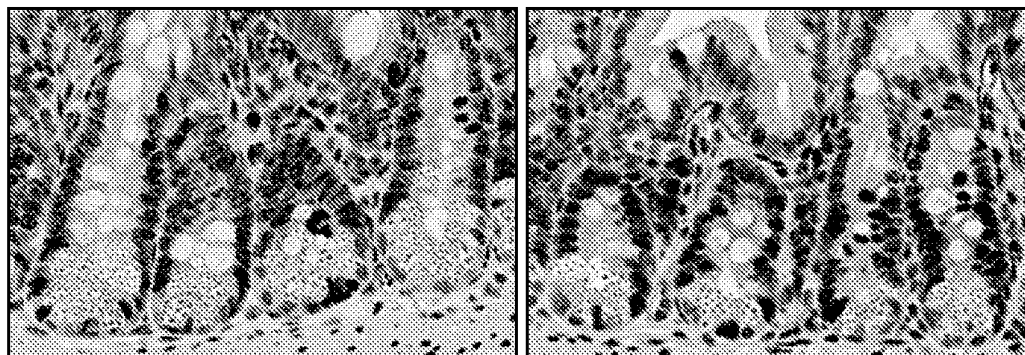
Rat 438-mIgG1

A2

Anti-Ki67 immunohistochemistry on mouse intestinal crypts
from Calu-6 efficacy study

28/28

FIG. 29



Rat 351-mlgG1

ANTI-E.TENELLA

Anti-Ki67 immunohistochemistry on mouse intestinal crypts
from 87393A1 NSCLC patient derived xenografts efficacy study

ANTICUERPOS ANTI-NOTCH1**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-notch1. La presente
5 invención también se refiere a los métodos de uso de tales anticuerpos en el
tratamiento de cáncer.

ANTECEDENTES

Los receptores Notch controlan el crecimiento, la diferenciación y la muerte de las
células normales en organismos multicelulares a través de una vía de señalización que
10 se desencadena por la proteólisis inducida por ligandos (Bray, Nat. Rev. Mol. Cell Biol.
7(9):678-689, 2006). El heterodímero Notch maduro después de la escisión de la
proteasa de tipo furina en el sitio S1 se mantiene en un estado autoinhibido por una
región regulatoria negativa de la yuxtamembrana (NRR) que consiste en tres
repeticiones Lin12/Notch (LNR-A, B, C) y el dominio de heterodimerización (HD). El
15 dominio HD se divide en mitades terminal N (HD1) y terminal C (HD2) por la escisión
en el sitio S1. A través de un mecanismo incierto, la unión de ligandos de la familia
Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) al terminal N, la región de la repetición de EGF reduce esta
inhibición e induce dos escisiones adicionales sucesivas en el S2 cerca de la región
HD-2 del terminal C y S3 dentro del dominio transmembrana en Notch, que se
20 catalizan por metaloproteinasa de tipo ADAM y gamma-secretasa, respectivamente
(Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volumen 14, 295-
300). La última escisión libera el dominio intracelular de Notch (Notch^{ICD}), que le
permite traslocarse al núcleo y activar la transcripción de los genes objetivo.

En las células de mamíferos, hay cuatro receptores Notch conocidos. Los
25 Notch1-4 tienen patrones superpuestos amplios de expresión en tejidos embrionarios y
adultos, y cumplen funciones no redundantes durante la especificación de las células
madre hematopoyéticas, el desarrollo de linfocitos T, la especificación de células de la
cripta intestinal y el desarrollo vascular. Las anomalías adquiridas que involucran
receptores Notch1 específicos se han involucrado en los distintos tipos de cáncer,
30 tales como la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), el cáncer de mama
y el cáncer de pulmón. Además, Notch1 activado es un potente inductor de la leucemia
en modelos murinos y se sobreexpresa en varios tumores sólidos, que incluyen cáncer
pulmonar de células no pequeñas, cáncer de mama y cáncer de ovario.

Más del 50% de los pacientes con T-ALL albergan mutaciones en el receptor
35 Notch1, algunas de las cuales producen la escisión constitutiva del receptor y la

producción de Notch1^{ICD} debido, en parte, a la hipersensibilidad del ligando de Notch1 o activación independiente del ligando causada por alteraciones en el dominio NRR auto-inhibitorio o cerca de este. Estas mutaciones se categorizan en 3 clases principales. Las mutaciones de Clase 1 son sustituciones de aminoácidos únicos y
5 pequeñas supresiones o inserciones en marco en HD1. Las mutaciones de Clase 2 son inserciones más largas en la región distal de HD2 que reubican el sitio de escisión de la metaloproteasa S2 más allá del dominio autoinhibidor NRR. Las mutaciones de Clase 3, también llamadas mutaciones por expansión de la yuxtamembrana (JME), se producen a partir de inserciones grandes que desplazan la NRR lejos de la membrana
10 celular.

Se están desarrollando varias estrategias para inhibir la señalización de Notch con fines terapéuticos en el cáncer. Un enfoque es bloquear la liberación proteolítica del Notch intracelular de la membrana por el tratamiento con los inhibidores de gamma-secretasa (GSI). Si bien los GSI han progresado en la clínica, no pueden
15 distinguir los receptores Notch individuales y causan toxicidad intestinal, atribuida a la inhibición de Notch1 y Notch2. Aún se necesitan en el arte nuevas terapias anti-Notch1 para el tratamiento del cáncer, mientras que se proporcionan efectos secundarios reducidos, en particular, toxicidad intestinal.

SÍNTESIS

20 En una forma de realización, la presente invención proporciona 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: 71.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona anticuerpos
25 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: 97.

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,
30 una región CDR2 y una región CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 71 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: 97.

También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una
35 secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es al menos

90 % idéntica a la SEQ ID NO: 71. Además, se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se indica en la SEQ ID NO: 71.

5 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: 97. Además, 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: 97.

10 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: 111. Además, 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: 111.

15 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: 113. Además se proporcionan anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que se indica en la SEQ ID NO: 113.

20 En una forma de realización adicional, la invención proporciona anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 71; y una secuencia de aminoácidos variable de la cadena liviana que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 97. Además se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se indica en la SEQ ID NO: 71; y secuencia de aminoácidos de la región variable de la
25 cadena liviana que se indica en la SEQ ID NO: 97.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona 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: 111; y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 113. Además, se
30 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: 111, y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que se indica en la SEQ ID NO: 113.

En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen al Notch1 humano, en donde los anticuerpos se unen a un epítoto que tiene, al
35 menos, 8 residuos de aminoácidos seleccionados de 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, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 y Leu 1718.

En otra forma de realización, la presente invención proporcionan anticuerpos
5 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
10 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
15 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:
20 115. 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
25 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
30 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.
35 También se proporcionan anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos de la

cadena liviana que se indica en la SEQ ID NO: 151.

En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 115; y una secuencia de aminoácidos 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 pesada que se indica en al SEQ ID NO: 115; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que se indica en la SEQ ID NO: 129.

En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 149; y 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 se unen a Notch1, que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, que se indica en la SEQ ID NO: 149, y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que se indica en la SEQ ID NO: 151.

En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a Notch1 humano, en donde los anticuerpos se unen a un epítipo que tiene al menos 8 residuos de aminoácidos seleccionados de 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 y Lys 1718.

En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos que demuestran una inhibición más alta 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 natural. También se establece que el receptor de Notch1 mutante tiene una mutación en la región regulatoria negativa (NRR). En una forma de realización adicional, la mutación en la NRR se selecciona del grupo que consiste en una mutación de clase 1, clase 2 y clase 3. En una forma de realización adicional, la mutación en la NRR se asocia con células que tienen una activación anormal de Notch1. También se establece que los linfocitos T-ALL se seleccionan de un grupo que consiste en células HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4 y DND-41.

También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1 y compiten por la unión a Notch1 con cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona anticuerpos

que se unen a Notch1 donde los anticuerpos son del isotipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. Además, se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1 donde el isotipo es IgG y en donde la subclase es IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄ o se deriva de estos. También se proporcionan anticuerpos que se unen a Notch1 donde la subclase se deriva de IgG₁.

5 En una forma de realización adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, o que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y/o livianas de anticuerpos descritas en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que tienen la secuencia que se indica en SEQ ID NO: 112. En una forma de
10 realización adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos que tienen la secuencia que se indica en SEQ ID NO: 114. En otra forma de realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que tienen la secuencia que se indica en SEQ ID NO: 150. En una forma de realización adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos que tienen la secuencia que se indica en SEQ ID NO: 152.

15 En una forma de realización adicional, la invención proporciona un vector que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente. En una forma de realización adicional, la invención proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los vectores descritos en la presente. En una forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para producir cualquiera de los
20 anticuerpos descritos en la presente, que comprende cultivar cualquier célula huésped descrita en la presente y recuperar los anticuerpos de los medios de cultivo. En una forma de realización adicional, la invención proporciona células huésped que producen cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente de manera recombinante. En una forma de realización, se aísla cualquiera de las células huésped descritas en la
25 presente.

 En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente y vehículos farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización adicional, la invención proporciona métodos para el tratamiento de trastornos en
30 sujetos que lo necesiten; dichos métodos comprenden administrar a los sujetos cualquiera de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas descritos en la presente. La invención también proporciona métodos para el tratamiento de trastornos que se asocian con la activación anormal de Notch1 en sujetos que lo necesiten; dichos métodos comprenden administrar a los sujetos cualquiera de los anticuerpos o
35 composiciones farmacéuticas descritos en la presente. En una forma de realización

adicional, la invención proporciona métodos para el tratamiento de trastornos, como la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), el cáncer de mama y el cáncer de colon, en sujetos que lo necesiten; dichos métodos comprenden administrar a los sujetos cualquiera de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas descritos en la presente. La invención también proporciona un método para el tratamiento de trastornos en sujetos que lo necesiten; dicho método comprende administrar a los sujetos cualquiera de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas descritos en la presente en combinación con uno o más agentes terapéuticos.

En otra forma de realización, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente para uso en la terapia. En una forma de realización adicional, la invención proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente para la fabricación de los medicamentos para la terapia. En una forma de realización adicional, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente para usar en el tratamiento de trastornos que se asocian con la activación anormal de Notch1 en sujetos que lo necesitan. En una forma de realización adicional, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente para usar en el tratamiento de trastornos, tales como leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama y cáncer de colon, en sujetos que lo necesitan.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona anticuerpos que se unen a Notch1 humano, de ratón y de cynomolgus (en adelante, "cyno"), pero no se unen a Notch2 humano. En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a Notch1 humano, de ratón y de cyno, pero no se unen a Notch3 humano y de ratón.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático del inmunógeno de la proteína NRR Notch1 heterodimérico, escindido en S1 y recombinante con marcas Avi y His.

La Figura 2 muestra NRR de Notch1 humano recombinante y constructos quiméricos de intercambio de dominio de Notch3 para el mapeo de epítipo de los anticuerpos anti-notch1 351-mIgG1, 438-mIgG1 y A2 de rata.

La Figura 3 muestra una vista estructural del epítipo de rata 438 sobre la NRR del Notch1 humano.

La Figura 4 muestra una vista estructural del epítipo 351 de rata sobre la NRR de Notch1 humano.

La Figura 5 muestra una vista estructural del epítipo A2 sobre la NRR de Notch1 humano.

La Figura 6 muestra la superposición de las estructuras de la NRR de Notch1 unido a los anticuerpos 438 y A2 de rata.

5 La Figura 7 muestra la superposición de las estructuras de la NRR de Notch1 (mostrado como cintas) unidas a los anticuerpos 351 de rata y A2 (mostrado como superficies moleculares).

La Figura 8 muestra la actividad neutralizante de los anticuerpos 438 VH1.1/VL1.8 humanizados, 438-mIgG1 de rata y A2 contra la señalización
10 dependiente en células informantes Notch1 humanas.

La Figura 9 muestra la actividad neutralizante de los anticuerpos 438 VH1.1/VL1.8 humanizados, 438-mIgG1 de rata y A2 contra la señalización dependiente de Notch1 en células informantes Notch1 de ratón.

La Figura 10 muestra la actividad neutralizante de los anticuerpos 351 de rata y
15 contra la señalización de Notch1 humano.

La Figura 11 muestra la actividad neutralizante de los anticuerpos 351 de rata y A2 contra la señalización de Notch1 de ratón.

La Figura 12 muestra la actividad neutralizante de las variantes 351 humanizadas, los anticuerpos 351-mIgG1 de rata y A2 contra la señalización
20 dependiente de Notch1 en células informantes de Notch1 humano.

La Figura 13 muestra la actividad neutralizante de las variantes 351 humanizadas, anticuerpos de 351-mIgG1 de rata y A2 contra la señalización dependiente de Notch1 en células informantes de Notch1 de ratón.

La Figura 14A y 14B muestra vistas estructurales de la interfaz de interacción
25 entre 351 de rata y NRR de Notch1 de rata en la región LNR-A.

La Figura 15 muestra la actividad neutralizante 351 de rata, 351 de rata mutante y A2 en ensayos del gen indicador del cocultivo.

La Figura 16 muestra imágenes representativas epifluorescentes de la inmunotinción CD31-Cy3 de los brotes de HUVEC en el día 10 del tratamiento con
30 438, 351 y A2 de rata, y medio de control solo y anticuerpo anti-VEGF.

La Figura 17 muestra imágenes confocales representativas de la tinción de Isolectin B4-Alexa488 en un modelo de angiogénesis retiniana de ratón después del tratamiento con anticuerpos 438-mIgG1 de rata, 351-mIgG1 de rata y A2, anticuerpo de control anti-E. tenella y sin tratamiento.

35 La Figura 18 muestra un análisis de transferencia Western de extractos de

proteína generados de fibroblastos humanos CCD1076SK sembrados sobre ligando DLL4 recombinante humano y tratado con concentraciones crecientes de anticuerpos 351, 438 y A2 de rata, y anticuerpo de control anti-E. tenella.

La Figura 19 muestra un análisis de transferencia Western de extractos de
5 proteína generados a partir de células HBP-ALL tratadas con concentraciones crecientes de anticuerpos 438 VH1.1/VL1.8 humanizados, 438-mIgG1 de rata y anticuerpo de control anti-E. tenella.

La Figura 20 muestra un análisis de transferencia Western de extractos de
10 proteína generados a partir de líneas celulares T-ALL tratadas con concentraciones crecientes de anticuerpos 351-mIgG1, 438-mIgG1 y A2 de rata, y anticuerpo de control anti-E. tenella.

La Figura 21 muestra la detección inmunohistoquímica de los receptores de Notch1 y del ligando Jagged1 en el xenoinjerto derivado de los pacientes NSCLC 37622A1.

La Figura 22 muestra un cromatograma que indica que el xenoinjerto derivado
15 de los pacientes NSCLC 37622A1 poseía una mutación G13V en el gen K-ras humano.

La Figura 23 muestra un análisis de transferencia Western de extractos de
20 proteína generados a partir de xenoinjertos derivados de los pacientes NSCLC 37622A1 tratados con anticuerpos 438-mIgG1 de rata, A2 y anticuerpos de control anti-E. tenella.

La Figura 24 muestra un análisis de transferencia Western de extractos de
proteína generados en xenoinjertos derivados de pacientes NSCLC 87393A1 tratados con anticuerpos 351-mIgG1 de rata y anticuerpos de control anti-E. tenella.

La Figura 25 muestra la detección inmunohistoquímica de la expresión de
25 involucrina en xenoinjertos derivados de pacientes NSCLC 87393A1 después del tratamiento con anticuerpos 351-mIgG1 de rata y anticuerpos de control anti-E. tenella.

La Figura 26 muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de
30 involucrina en xenoinjertos derivados de pacientes NSCLC 87393A1 después del tratamiento con anticuerpos 351-mIgG1 de rata y anticuerpos de control anti-E. tenella.

La Figura 27 muestra la identificación histoquímica de células caliciformes
secretoras mediante la tinción con azul Alcian sobre la sección íleon de los intestinos de ratón del estudio de eficacia Calu-6 tratados con 438-mIgG1 de rata, A2 y anticuerpo de control anti-E. tenella.

La Figura 28 muestra la inmunohistoquímica anti-Ki67 en criptas intestinales de
35

ratón del estudio de eficacia Calu-6 tratados con 438-mIgG1 de rata, A2 y anticuerpo de control anti-E. tenella.

La Figura 29 muestra una inmunohistoquímica anti-Ki67 en criptas intestinales de ratón del estudio de eficacia de xenoinjertos derivados del paciente 87393A1 tratado con anticuerpos 351-mIgG1 de rata y anticuerpo de control anti-E. tenella.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados, en particular, anticuerpos monoclonales humanos, humanizados, quiméricos y de rata que se unen a Notch1. Además, la presente descripción proporciona anticuerpos aislados que demuestran una inhibición más alta de la activación de Notch1 de un receptor de Notch1 mutante comparada con la inhibición de la activación de Notch1 de un receptor de Notch1 natural. La descripción proporciona anticuerpos aislados y métodos de obtener tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos. La presente descripción también se refiere a inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que contienen tales anticuerpos. La descripción también se refiere a los métodos de uso de los anticuerpos para inhibir la activación de Notch1 y tratar varias enfermedades relacionadas con el crecimiento celular anormal, tal como cáncer (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de ovario.

Técnicas generales

A menos que se indique lo contrario, los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales conocidos en el arte y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se mencionan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane Anticuerpos: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), que se incorporan en la presente por referencia.

Definiciones

“Notch1” o “Notch-1” se refieren a las formas naturales, variantes, isoformas y

especies homólogas de la proteína de Notch1 humano. La proteína de Notch1 humano natural, por ejemplo, se compone de un péptido líder, una región grande de repetición tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), tres repeticiones Lin12, un dominio de heterodimerización terminal N (HD-1), un dominio de heterodimerización terminal C (HD-2), una secuencia transmembrana (TM) y un dominio intracelular (Notch1^{ICD}). El número de acceso NCBI/GenBank de Notch1 humano de longitud completa es NM_017617.2.

“Región regulatoria negativa de Notch1” o “NRR de Notch1”, como se usa en la presente, a menos que se indique de otro modo, se refieren a cualquier región polipeptídica nativa o sintética de Notch1 que consiste en tres dominios Lin12 y la secuencia o secuencias de aminoácidos ubicadas entre los tres dominios Lin12, más los dominios HD1 y HD2 de Notch1. En una forma de realización, la “NRR de Notch1” incluye los tres dominios Lin12 y dos dominios de heterodimerización HD-1, y HD-2, en donde los dominios HD-1 y HD-2 de Notch1 se unen en forma covalente y no se escinden con la proteasa tipo furina (antes de la escisión S1). En otra forma de realización, la “NRR de Notch1” incluye los tres dominios Lin12 y los dos dominios de heterodimerización HD-1, y HD-2, en donde los dominios HD-1 y HD-2 de Notch1 se unen en forma no covalente (después de la escisión de S1). En un aspecto de esta forma de realización, el sitio S2 dentro del dominio HD-2 no se ha escindido con las metaloproteasas tipo ADAM. En otro aspecto particular de esta forma de realización, el sitio S2 dentro del dominio HD-2 se escinde o ya se ha escindido con las metaloproteasas tipo ADAM. (Gordon, W.R., et al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volumen 14, 295-300).

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término abarca no solo anticuerpos monoclonales o policlonales, sino también fragmentos de estos (por ejemplo, porciones de unión al antígeno) (tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), anticuerpos de cadena simple (scFv), anticuerpos del dominio, tales como anticuerpos de tiburón y de camélidos, y proteínas de fusión, que comprenden una porción del anticuerpo (tal como anticuerpos del dominio), y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de esta), y no es necesario que el

anticuerpo sea de alguna clase particular). En función de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales (isotipos) de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir en subclases, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son conocidas.

Se pretende que un “anticuerpo aislado”, como se usa en la presente, se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a Notch1 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de Notch1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a Notch1 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas Notch-1 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

Como se usa en la presente, “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico.

El anticuerpo “humanizado” se refiere a las formas de anticuerpo no humanas (por ejemplo, murino), que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de estas, tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Con preferencia, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor), en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv (FW) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos

correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o estructurales importadas, pero se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a la inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de FW son las de una secuencia de consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región o dominio constante de una inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 o H-CDR3), que están alteradas con respecto al anticuerpo original, y que también se denominan una o más CDR “derivadas de” una o más CDR del anticuerpo original.

“Anticuerpo humano” o “anticuerpo completamente humano” incluyen anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones estructurales y CDR se derivan de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la descripción pueden incluir los residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada humana o al menos un polipéptido de la cadena liviana humana. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en el arte.

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

La expresión “anticuerpo recombinante”, como se usa en la presente, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes. Tales anticuerpos recombinantes tienen regiones variables en que las

regiones estructurales y CDR se derivan de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal. Sin embargo, en ciertas formas de realización, tales anticuerpos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig, a mutagénesis somática *in vivo*) y, en consecuencia, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan de las secuencias VH y VL de la línea germinal y se relacionan con estas, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo *in vivo*.

Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan en forma indistinta en la presente con la expresión “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”.

Como se sabe en el arte, la expresión “región Fc” se usa para definir una región terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina (CH₂+CH₃). La “región Fc” puede ser una región Fc de secuencia natural o una variante de la región Fc.

Una “región Fc de secuencia natural” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Una “variante de la región Fc” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de, al menos, una modificación de aminoácidos, pero retiene al menos una función de región Fc de la secuencia nativa.

Las expresiones “receptor de 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 la secuencia natural. Además, 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, lo que incluye las variantes alélicas y, en forma alternativa, formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en el inmunorreceptor tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. Como será apreciado por los expertos en el arte, el receptor FcγRIIB inhibidor contiene un motivo de inhibición basado en el inmunorreceptor tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. Los FcR se han sido ampliamente revisados y son conocidos por los expertos en el arte. Otros FcR, que incluyen los que se identificarán en el futuro, están incluidos en el término “FcR” de la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es

responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto y la vida media prolongada de las IgG.

El término “se une” se refiere a una afinidad entre dos moléculas, por ejemplo, un antígeno y un anticuerpo. Un anticuerpo que “se une específicamente a Notch1” se refiere a una unión preferencial de un anticuerpo al antígeno Notch1 en una muestra que comprende múltiples antígenos diferentes, con una diferencia en K_D de al menos 100 veces o, con preferencia, 1.000 veces.

El término “afinidad alta” se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1×10^{-6} M o menos, con mayor preferencia, que tiene una K_D de 1×10^{-8} M o menos. La afinidad se puede medir mediante, por ejemplo, resonancia plasmónica superficial.

“Epítotope” incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas químicamente activas en superficie, tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

El término “ k_{on} ”, como se usa en la presente, se refiere a la tasa de asociación, o tasa de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término “ k_{off} ,” como se usa en la presente, se refiere a una la tasa de disociación, o velocidad de disociación de la interacción de anticuerpo-antígeno particular. El término “ K_D ”, como se usa en la presente, se refiere a la constante de disociación en equilibrio, que se obtiene de la relación de k_{off} a k_{on} (es decir, k_{off}/k_{on}) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D para los anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en el arte. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es el uso de resonancia plasmónica superficial, normalmente mediante un sistema biosensor, como un sistema Biacore®.

Los términos “polipéptido”, “oligopéptido”, “péptido” y “proteína” se usan en forma indistinta en la presente para referirse a las cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, con preferencia, relativamente cortas (por ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o se puede interrumpir con no aminoácidos. Se entiende que los polipéptidos pueden aparecer como cadenas simples o cadenas asociadas.

Como se conoce en el arte, “polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se usan indistintamente en la presente, se refieren a las cadenas de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos,

ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en una cadena por ADN o ARN polimerasa.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena liviana del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sea sola o en combinación. Como se conoce en el arte, las regiones variables de la cadena pesada y liviana consisten cada una en cuatro regiones estructurales (FW) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR de cada cadena se mantienen muy cerca de las FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno de los anticuerpos.

Una “CDR” de un dominio variable son residuos de aminoácidos dentro de la región variable que se identifican de acuerdo con las definiciones del Kabat, Chothia, la acumulación de definiciones de Kabat y Chothia, AbM, de contacto, y/o conformacionales o cualquier método de la determinación de CDR conocido en el arte.

Las CDR del anticuerpo se pueden identificar como regiones hipervariables originalmente definidas por Kabat et al. Ver, por ejemplo, Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también se pueden identificar como el bucle estructural originalmente descrito por Chothia y otros. Ver, por ejemplo, Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883. Otros enfoques de la identificación de CDR incluyen la “definición de AbM”, que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva usando el programa de computación de modelado del anticuerpo Abm de Oxford Molecular (ahora Accelrys®) o la “definición de contacto” de las CDR basadas en los contactos de antígeno observados, expuestos en MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. En otro enfoque, denominado en la presente “definición conformacional” de las CDR, las posiciones de las CDR se pueden identificar como los residuos que realizan contribuciones entálpicas a la unión del antígeno. Ver, por ejemplo, Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Incluso otras definiciones de límite de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero no obstante no se superpondrán con al menos una porción de las CDR de Kabat, si bien estas se pueden acortar o prolongar a la luz de la predicción o hallazgos experimentales de que los residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR completas no impactan significativamente en la unión del antígeno. Como se usa en la presente, una CDR se puede referir a las CDR definidas por cualquier enfoque conocido en el arte, lo que incluye combinaciones de enfoques. Los métodos usados

en la presente pueden utilizar las CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier forma de realización que contiene más de una CDR, las CDR se pueden definir de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendidas, AbM, de contacto y/o conformacionales.

5 Una “región constante” de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena liviana del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, sea sola o en combinación.

 Una “célula huésped” incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de los vectores para la incorporación de los insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a la mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con uno o más polinucleótidos de la presente descripción.

15 Como se usa en la presente, “vector” significa un constructo, que es capaz de administrar y, con preferencia, expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, entre otros, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucarióticas, tales como células productoras.

 Como se usa en la presente, “secuencia de control de expresión” significa una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o un inducible, o un potenciador. La secuencia de control de expresión está unida operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos transcrita.

 Como se usa en la presente, “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluyen cualquier material que, al combinarse con un ingrediente activo, permite que el ingrediente retenga la actividad biológica y es no reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos incluyen, entre otros, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándares, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsión de aceite/agua, y varios tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para la administración en aerosol o parenteral son solución salina tamponada con fosfato (PBS) o normal (0,9 %). Las composiciones que comprenden tales vehículos se

formulan mediante métodos convencionales conocidos.

Un “individuo” o un “sujeto” es un mamífero, con mayor preferencia, un ser humano. Los mamíferos también incluyen, entre otros, animales de granja, animales de deporte, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

5 Una “proteína aislada”, un “polipéptido aislado” o un “anticuerpo aislado” es una proteína, un polipéptido o un anticuerpo que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no están asociados con componentes asociados naturalmente que los acompañan en su estado nativo, (2) están libres de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresan mediante una célula de una especie diferente o (4) no existen
10 en la naturaleza. En consecuencia, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula de la cual se origina naturalmente estará “aislado” de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína también se puede producir de manera sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente por aislamiento, por medio de técnicas de purificación de
15 proteína bien conocidas en el arte.

Receptor de Notch1

El ADNc de Notch1 humano codifica una proteína de 2556 residuos de aminoácidos que consisten en un péptido líder, 36 repeticiones de tipo EGF, región
20 regulatoria negativa (NRR), una secuencia transmembrana (TM) y un dominio intracelular (Notch1^{ICD}).

Anticuerpos anti-notch1 que se unen a NRR

En la presente descripción, está contemplado que los anticuerpos que se unen
25 al dominio de Notch1 con una afinidad alta pueden reducir la transducción de señal de Notch1 y, en consecuencia, pueden demostrar actividad biológica *in vitro* e *in vivo* para inhibir el crecimiento de las células cancerosas, en particular, de Leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de ovario. Tales anticuerpos se
30 pueden producir siguiendo métodos generales conocidos por los expertos en el arte. En una forma de realización, tales anticuerpos se pueden producir mediante la inmunización de una rata con un inmunógeno, seguido por la clonación del hibridoma de los anticuerpos así generados y el análisis de los anticuerpos clonados mediante varios ensayos. Por ejemplo, se puede usar el inmunoensayo ELISA de fase sólida,
35 inmunoprecipitación, BIAcore, FACS y análisis de transferencia Western, entre la gran

cantidad de ensayos empleados para identificar un anticuerpo que reacciona específicamente con Notch1. La afinidad de unión de Notch1 de los anticuerpos seleccionados de acuerdo con el ensayo ELISA se puede medir con un instrumento de resonancia plasmónica superficial Biacore®.

5 Los anticuerpos anti-notch1 de la presente descripción se pueden producir por cualquier otro método conocido en el arte diferente de los descritos en el párrafo anterior. Generalmente, la vía y el esquema de inmunización del animal huésped son conformes a las técnicas convencionales y establecidas para la estimulación y producción del anticuerpo, que también se describen en la presente. Las técnicas
10 generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón son conocidas en el arte y/o se describen en la presente.

Anticuerpos anti-notch1 generados por tecnologías del hibridoma.

En la presente descripción, está contemplado que cualquier sujeto mamífero,
15 incluidos los seres humanos o las células productoras de anticuerpos de estas se pueden manipular para que funcionen como base para la producción de líneas celulares de hibridomas, que incluyen las humanas. Normalmente, el animal huésped se inocula por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluidas las que se describen en la
20 presente.

Los hibridomas se pueden preparar a partir de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas usando la técnica general de hibridación de células somáticas de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497 o modificada por Buck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381 (1982). Los hibridomas que se pueden usar como una fuente
25 de anticuerpos abarcan todos los derivados, las células de progenie de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para Notch1, o una porción de este.

Los hibridomas que producen tales anticuerpos se pueden cultivar *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden
30 aislar del medio de cultivo o de los fluidos corporales mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales.

Humanización de anticuerpos anti-notch1 generados mediante inmunización en un animal huésped.

35 En la presente descripción, se contempla que los anticuerpos anti Notch1 de la

descripción, en donde los anticuerpos se generan mediante inmunización en un animal huésped, se pueden manipular de muchas maneras para mejorar su actividad biológica y propiedades farmacéuticas. Una forma de tal manipulación es la humanización.

5 Los métodos para humanizar anticuerpos son conocidos por los expertos en el arte. En general, existen cuatro etapas básicas para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y aminoácidos antedicha de los dominios variables liviano y pesado del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región estructural del
10 anticuerpo se usa durante el proceso de humanización (3) las metodologías/técnicas de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado.

En la bibliografía se han descrito algunas moléculas de anticuerpo “humanizado” que comprenden un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, lo que incluye anticuerpos quiméricos que tienen
15 regiones V de roedores o regiones V modificadas de roedores y sus CDR asociados fusionados con los dominios constantes humanos; CDR de roedores injertados en una región estructural (FR) de soporte humano antes de la fusión con un dominio constante del anticuerpo humano adecuado; y CDR de roedores soportados por regiones estructurales de roedores manipuladas de manera recombinante. Tales
20 moléculas “humanizadas” se diseñan para minimizar la respuesta inmunológica no deseada con respecto a las moléculas de anticuerpo anti-humano de roedor, que limitan la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de estas porciones en los receptores humanos.

25 Anticuerpos anti-notch1 humanos

En la presente descripción, se contempla que los anticuerpos anti-Notch1 completamente humanos se pueden obtener por medio de ratones disponibles en el comercio que se han manipulado genéticamente a fin de que expresen proteínas de la inmunoglobulina humana específicas. Los animales transgénicos que se diseñan para
30 producir una respuesta inmunitaria más conveniente (por ejemplo, anticuerpo completamente humano) o más robusta también se pueden usar para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Los ejemplos de tales tecnologías son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

35 También se contempla dentro de la presente descripción que los anticuerpos

anti-Notch1 completamente humanos se pueden obtener en forma recombinante siguiendo métodos generales de tecnología de despliegue en fagos, como resulta evidente para los expertos en el arte. En forma alternativa, la tecnología de despliegue en fagos se puede usar para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpo humanos *in vitro*, a partir de repertorios del gen del dominio de variable (V) de la inmunoglobulina proveniente de dadores no inmunizados.

La transposición génica también se puede usar para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo de roedor de partida. Si bien la descripción anterior pertenece a los anticuerpos humanizados y humanos, los principios generales descritos son aplicables para adaptar los anticuerpos para usar, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descrito en la presente pueden ser combinados, por ejemplo, injerto de CDR, mutación estructural y mutación de CDR.

15

Anticuerpos anti-notch1 manipulados genéticamente y modificados obtenidos en forma recombinante

En general, los anticuerpos se pueden obtener en forma recombinante mediante la colocación de secuencias de ADN del anticuerpo deseado en los vectores de expresión seguido por la transfección y expresión en las células huésped, que incluyen, entre otras, células de E. coli, células COS de simio, células de ovarios de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina. También se pueden usar otras células huésped, tales como células de plantas transgénicas o células de leche transgénica.

Un anticuerpo también se puede modificar de modo recombinante. Por ejemplo, se puede usar el ADN de las regiones constantes de las cadenas pesada y liviana humanas en lugar de secuencias murinas homólogas del ADN del anticuerpo murino, o uniendo de manera covalente a la secuencia codificadora de la inmunoglobulina la totalidad o una parte de la secuencia codificadora para un polipéptido de no inmunoglobulina. De manera similar, se pueden preparar los anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-Notch1 de la presente.

Las regiones variables del anticuerpo también se pueden modificar mediante injertos de CDR. Debido a que las secuencias de CDR son predominantemente responsables de la mayor parte 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 las secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes.

5 Por consiguiente, otro aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, que comprende una región variable de la cadena pesada, que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en la presente, y una región variable de la cadena liviana, que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en la presente. En consecuencia, tales anticuerpos contienen las
10 secuencias VH y VL de CDR de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente, pero pueden contener secuencias estructurales diferentes de estos anticuerpos. Tales secuencias estructurales se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas o de referencias publicadas que incluyen referencias publicadas que incluyen secuencias génicas del anticuerpo de línea germinal.

15 Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL para mejorar así una o más propiedades de unión (por ejemplo, la afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por PCR se pueden realizar para introducir la mutación y el efecto en la unión del anticuerpo, u otra propiedad
20 funcional de interés se puede evaluar usando ensayos *in vitro* o *in vivo* descritos anteriormente. Normalmente, se introducen las modificaciones conservadoras (como se describe a continuación). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. Además, normalmente se modifican no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región de CDR.

25

Mapeo de epítotope

Los epítotope de unión de los anticuerpos monoclonales en un antígeno se pueden mapear mediante numerosos métodos, de acuerdo con el tipo de interacción antígeno-anticuerpo.

30 Si un anticuerpo se une a un único epítotope que consiste en residuos de aminoácidos secuenciales en un antígeno, cuya unión usualmente no está afectada por los cambios conformacionales del antígeno, el epítotope de unión se llama epítotope lineal. Se puede determinar la secuencia de aminoácidos de un epítotope lineal mediante la utilización de técnicas conocidas en el arte. Un epítotope no lineal que se
35 constituye por varios segmentos secuencialmente discontinuos o residuos no

contiguos que se unen por el plegamiento del antígeno a su estructura natural se conoce como un epítope conformacional.

El mapeo de epítopes conformacionales depende de la interacción del anticuerpo con el antígeno en su conformación natural. Muchas técnicas conocidas en el arte son útiles para determinar los epítopes conformacionales. Por ejemplo, la co-cristalización del complejo antígeno-anticuerpo, la difracción de rayos X y el análisis estructural proporciona la visualización de la dirección de la interacción antígeno-anticuerpo. Cuando se combinan con la mutagénesis de aminoácidos, las tecnologías pueden proporcionar evidencia poderosa y una imagen vívida de los epítopes de unión del anticuerpo. El epítope o el conjunto de epítopes al que se une cada uno de los anticuerpos anti-Notch1 se pueden determinar de acuerdo con los métodos de mapeo anteriores u otros métodos generalmente conocidos en el arte.

Sustituciones conservadoras

Un anticuerpo también se puede modificar en forma recombinante mediante la sustitución conservadora de uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo o mediante una o más supresiones o adiciones de aminoácidos respecto del anticuerpo. Las inserciones de la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de los terminales amino y/o carboxilo, que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo del terminal N o el anticuerpo fusionado a una marca de epítope. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el terminal N o terminal C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en la circulación sanguínea.

Las variantes de sustitución tienen, al menos, un residuo de aminoácido eliminado de la molécula de anticuerpo y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también están contempladas las alteraciones de la FR.

Anticuerpos anti-notch1 de afinidad madura

La descripción incluye formas de realización de afinidad madura. Por ejemplo, los anticuerpos de afinidad madura se pueden producir mediante procedimientos conocidos en el arte (tal como 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 PCT Publicación N.º WO2004/058184). Tales métodos se pueden usar para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR.

5

Modificación postraducción de los anticuerpos anti-notch1

Los anticuerpos también se pueden modificar mediante modificaciones postraducción, que incluyen, entre otros, glucosilación con diferentes azúcares, acetilación, y fosforilación mediante técnicas conocidas en el arte.

10 Otros métodos de modificación pos-traducción incluyen técnicas de acoplamiento conocidas en el arte, que incluyen, entre otras, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Las modificaciones se pueden usar, por ejemplo, para la unión de marcas para el radioinmunoensayo.

15 Anticuerpos anti-notch1 con región constante modificada

En algunas formas de realización de la descripción, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, es decir, no desencadena lisis mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC) o no activa la microglia; o tiene actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en alguno o más de los siguientes aspectos: desencadenamiento de lisis mediada por complemento, estimulación de citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), o activación de la microglia. Las diferentes modificaciones de la región constante se pueden usar para obtener el nivel y/o la combinación óptimos de las funciones efectoras. Ver, 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).

30 En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de IgG1 de la cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: L234A/L235A/G237A en la región bisagra inferior que produce actividades de ADCC y CDC sustancialmente reducidas. Ver, por ejemplo, US20090155256.

35 Generalmente, las modificaciones dentro de la región Fc se pueden usar para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la vida media

sérica, la fijación del complemento, la unión del receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. Además, un anticuerpo de la descripción se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más residuos químicos al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su patrón de glucosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.

Otra modificación de los anticuerpos de la presente que se contempla en la descripción es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegilar, por ejemplo, para aumentar la vida media biológica (por ejemplo, suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento de este, normalmente, se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como derivado de éster o aldehído reactivo de PEG, en condiciones en que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Normalmente, la pegilación se lleva a cabo por 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, el término “polietilenglicol” abarca cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivar otras proteínas, tales como mono (C1 a C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertos casos, el anticuerpo pegilado es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidas en la técnica y se pueden aplicar para los anticuerpos de la presente descripción.

20

Proteína de fusión

La descripción también abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos o polipéptidos de esta descripción. En una forma de realización, se proporciona 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 descripción. En otras formas de realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región de la cadena liviana variable y/o al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 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

35

anticuerpos de la presente descripción. En otra forma de realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR de los anticuerpos de la presente descripción. A los fines de esta descripción, una proteína de fusión contiene uno o más anticuerpos y otra secuencia de aminoácidos a la que no se une la molécula nativa, por ejemplo, una
5 secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Los ejemplos de secuencias heterólogas incluyen, entre otras, una “marca” tal como una marca FLAG o una marca 6His.

Un polipéptido de fusión se puede crear por métodos conocidos en el arte, por ejemplo, en forma sintética o recombinante.

10

Moléculas biespecíficas

Un anticuerpo de la descripción, o sus porciones de unión al antígeno, se pueden derivar o unir a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula
15 biespecífica que se une, al menos, a dos sitios de unión o moléculas objetivo diferentes. El anticuerpo de la descripción, en efecto, se puede derivar o ligar a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas objetivo diferentes, tales como moléculas multiespecíficas que se consideran abarcadas por la expresión “molécula biespecífica”
20 como se usa en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la descripción, un anticuerpo de la descripción se puede ligar en forma funcional (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que se produce una molécula
25 biespecífica.

Anticuerpos de cadena simple

Un anticuerpo de la descripción puede ser un anticuerpo de cadena simple (scFv) en que las regiones variables de la cadena pesada y liviana (región Fv) se han
30 conectado con un ligador flexible para formar una cadena de polipéptido simple, que forma una región de unión con el antígeno. Tales anticuerpos monocatenarios se pueden preparar por la fusión del ADN que codifica un péptido ligador entre los ADN que codifican los polipéptidos de los dos dominios variables (VL y VH). Los polipéptidos resultantes se pueden plegar de nuevo para formar monómeros de unión
35 al antígeno, o pueden formar multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros o

tetrámeros), que dependen de la longitud de un péptido flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al. (1997) Prot. Eng. 10:423; Kortt et al. (2001) Biomol. Eng. 18:95-108). Por la combinación de diferentes polipéptidos que comprenden VL y VH, se pueden formar scFv multiméricos que se unen a diferentes epítopes (Kriangkum et al. (2001) Biomol. Eng. 18:31-40). Los anticuerpos monocatenarios se pueden producir usando varias técnicas conocidas en el arte.

Inmunos conjugados

Un anticuerpo de la descripción puede ser un inmunos conjugado o conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Los inmunos conjugados combinan la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales con la potencia de los agentes quimioterapéuticos.

Polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-notch1

La descripción también proporciona polinucleótidos aislados que codifican anticuerpos y péptidos de la descripción, y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

En un aspecto, la descripción proporciona composiciones, tales como una composición farmacéutica, que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la descripción. En algunas formas de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la descripción. 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 descripción.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de obtener alguno de los polinucleótidos que se describen en la presente.

Los polinucleótidos complementarios a tales secuencias también están abarcados por la presente descripción. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificadores o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de HnARN, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de una manera uno a uno, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificadoras o no codificadoras adicionales pueden, pero no necesariamente, están presentes dentro de un polinucleótido de la presente descripción, y un polinucleótido puede, pero no necesariamente, está ligado a otras

moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una porción de este) o pueden comprender una variante de tal secuencia. Las variantes de polinucleótido contienen
5 una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones de modo que la inmunorreactividad del polipéptido codificado no está disminuida con respecto a la molécula inmunorreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado generalmente se puede evaluar como se describe en la presente. Las variantes, con preferencia, exhiben al menos aproximadamente 70 % de identidad, con
10 mayor preferencia, al menos aproximadamente 80 % de identidad, aun con mayor preferencia, al menos aproximadamente 90 % de identidad, y con máxima preferencia, al menos aproximadamente 95 % de identidad con respecto a una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo nativo o una porción en este.

Se considera que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son
15 “idénticas” si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinea para correspondencia máxima.

Los expertos en el arte apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, como se describe en la presente. Algunos de estos polinucleótidos portan
20 homología mínima con respecto a la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codón están específicamente contemplados por la presente descripción. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos provistas en la presente están dentro del alcance de la presente descripción. Los alelos son genes
25 endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, pero no necesariamente, tienen una estructura o función alterada. Los alelos se pueden identificar mediante técnicas estándares (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencia de bases de datos).

30 Los polinucleótidos de esta descripción se pueden obtener usando síntesis químicas, métodos recombinantes o PCR.

Para preparar polinucleótidos usando métodos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada se puede insertar en un vector adecuado vector, y el vector a su vez se puede introducir en una célula huésped
35 adecuada para la replicación y amplificación. Los vectores de clonación adecuados se

pueden construir de acuerdo con técnicas estándares, o se pueden seleccionar de un cantidad grande de vectores de clonación en el arte. Si bien el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped destinada para el uso, los vectores de clonación útiles generalmente tendrán la capacidad de autoreplicarse, pueden poseer un solo objetivo para una endonucleasa de restricción adicional y/o pueden portar genes para un marcador que se puede usar para seleccionar clones que contienen el vector.

Los vectores de expresión generalmente son constructos de polinucleótido replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la descripción. Esto implica que un vector de expresión puede ser replicable en las células huésped sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Los componentes del vector generalmente pueden incluir, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminator).

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés se pueden introducir en la célula huésped por alguno de los diversos medios apropiados, que incluyen electroporación, transfección que emplea cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso tal como virus de vacuna). La elección de introducir vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de la célula huésped.

La descripción también proporciona células huésped que comprenden alguno de los polinucleótidos que se describen en la presente. Cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogo se pueden usar a fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, el polipéptido o la proteína de interés. Las células huésped que no son de mamíferos adecuadas incluyen procariotas (tales como E. coli o B. subtilis) y levaduras (tales como S. cerevisiae, S. pombe; o K. lactis). Con preferencia, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces superior, con mayor preferencia, 10 veces superior, aun con más preferencia, 20 veces superior que el del correspondiente anticuerpo endógeno o proteína de interés, si está presente, en las células huésped.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de

anticuerpos monoclonales, o porciones que se ligan a antígenos de estos, de la presente descripción, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir un anticuerpo, un inmunoconjugado o una molécula biespecífica de la descripción, o una combinación de estos (por ejemplo, uno
5 o más). Por ejemplo, una composición farmacéutica de la descripción puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se ligan a diferentes epítopes en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción también pueden ser
10 administradas en 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, por lo menos, con otro agente antiinflamatorio, contra el cáncer o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en terapia de combinación se describen luego en más detalle en la sección de
15 usos de los anticuerpos de la descripción.

Como se usa en la presente, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Típicamente, el vehículo es adecuado
20 para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). En función de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, una porción que liga antígenos de éste, un inmunoconjugado, o una molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras
25 condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

En algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente descripción pueden estar presentes en una forma neutra (incluyendo formas zwitteriónicas) o como una especie cargada positivamente o negativamente. En algunos casos, los anticuerpos se pueden convertir en complejos con un contraión para formar una sal
30 farmacéuticamente aceptable. Por ello, los compuestos farmacéuticos de la descripción pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables.

Una “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental (por ejemplo anticuerpo) y no imparte efectos toxicológicos indeseados (ver por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J.
35 Pharm. Sci. 66:1-19). Por ejemplo, la expresión “sal farmacéuticamente aceptable”

incluye un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraiones, en donde los contraiones derivan de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como los ácidos clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como también de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como los ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, los ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, los ácidos hidroxialcanóicos, los ácidos aromáticos, alifáticos y sulfónicos aromáticos, y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Además, las bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen iones metálicos. Los iones metálicos incluyen, entre otros, sales de metales alcalinos apropiados, sales de metales alcalinotérreos y otros iones metálicos fisiológicamente aceptables. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen las sales de aluminio, amonio, calcio, cobalto, níquel, molibdeno, vanadio, manganeso, cromo, selenio, estaño, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, sales mangánicas, manganosas, potasio, rubidio, sodio y zinc, y en sus valencias usuales.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de los anticuerpos de la presente descripción se pueden preparar de los siguientes ácidos, incluidos, entre otros, el 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, metanosulfónico, fosfórico, fosfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, amonio, bencenosulfónico, pantoténico, naftalenosulfónico, toluenosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, sulfúrico, nítrico, nitroso, monometiléster del ácido sulfúrico, ciclohexilaminosulfónico, β -hidroxibutírico, glicina, glicilglicina, glutámico,

cacodilato, diaminohexanoico, canfosulfónico, glucónico, tiociánico, oxoglutarico, piridoxal 5-fosfato, clorofenoxiacético, undecanoico, N-acetil-L-aspartico, galactárico y galacturónico.

Las bases orgánicas farmacéuticamente aceptables 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, etanodiamina, butilamina, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, etilglucamina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, imidazol, isopropilamina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piridina, piridoxina, neodymio, 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-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxi-alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos aromáticos y alifáticos, estroncio, tricina, hidrazina, fenilciclohexilamina, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano, ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico, ácido 1,4-piperazinadietanosulfónico, ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico, 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano, ácido 4-morfolinopropanosulfónico, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico, ácido 2-[(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]etanosulfónico, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico, ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico, ácido 3-(N,N-bis[2-hidroxietil]amino)-2-hidroxiopropanosulfónico, ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanosulfónico, 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico), piperazina-1,4-bis(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico) dihidrato, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanosulfónico, N,N-bis(2-hidroxietil)glicina, N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 4-butanosulfónico), ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico, ácido N-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutanosulfónico, ácido N-(1,1-dimetil-2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico, ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico, ácido N-(2-acetamido)iminodiacético, ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico, N-[tris(hidroximetil)metil]glicina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol y trometamol.

Una composición farmacéutica de la descripción también puede incluir un

antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables 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
5 palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden
10 emplear en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el
15 mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede ser asegurada por
20 procedimientos de esterilización, como se puede ver más atrás, y por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol ácido sórbico, y similares. También puede ser conveniente incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse
25 mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para
30 sustancias farmacéuticamente activas se conoce en el arte. Excepto cuando un medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de estos en las composiciones farmacéuticas. Los compuestos activos suplementarios también pueden ser incorporados en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente tienen que ser estériles y estables
35 bajo las condiciones de preparación y almacenamiento. La composición puede ser

formulada como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración del fármaco. El vehículo 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 sus mezclas adecuadas.

- 5 La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones
- 10 inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, y luego

15 mediante microfiltración de esterilización. En general, las dispersiones son preparadas incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados más atrás. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen, entre otros, secado al vacío y secado por

20 congelación (liofilización) que permiten obtener un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución de este previamente filtrada en forma estéril.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma de dosificación individual variará en función del

25 sujeto que recibe el tratamiento y del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, de 100 %, esta cantidad oscilará entre alrededor de 0,01 % a alrededor de 99 % de ingrediente activo,

30 preferentemente de alrededor de 0,1 % a aproximadamente 70 %, con mayor preferencia de alrededor de 1 % a alrededor de 30 % de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede

35 administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o

la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, en función de las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. La forma de dosis unitaria, como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que recibirán tratamiento; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en relación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitarias de la descripción dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser alcanzado, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de la preparación de compuestos, tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosis oscila entre alrededor de 0,0001 a 100 mg/kg, y con más frecuencia de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 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 dentro del rango de 1 a 10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo comprende la administración una vez por semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez por mes, una vez cada 3 meses o una vez cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosis para un anticuerpo anti-Notch1 de la descripción incluyen, por ejemplo, 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa; el anticuerpo se administra usando uno de los siguientes esquemas 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 simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de ligadura, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado está comprendida en los rangos indicados. El anticuerpo es administrado usualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo al antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para alcanzar una concentración plasmática de anticuerpo de alrededor de 1 a 1000 µg/ml y en algunos métodos de alrededor de 25 a 300 µg/ml.

Alternativamente, el anticuerpo puede ser administrado como una formulación

de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían en función de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más prolongada, luego se encuentran los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar en función de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un período de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere algunas veces una dosis relativamente alta a intervalos de tiempo relativamente cortos hasta que se reduce o se termina el avance de la enfermedad y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Luego, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden variar, 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 una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción empleadas, o su éster, sal o amida, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica previa del paciente que recibe tratamiento, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Una “dosis terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo anti-Notch de la descripción da por resultado preferentemente una disminución en la gravedad los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y la duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del empeoramiento o discapacidad como consecuencia del padecimiento de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores positivos a Notch1, una “dosis terapéuticamente eficaz” preferentemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en, al menos, alrededor de 20 %, con mayor preferencia en, al menor, alrededor de 40 %, incluso con mayor preferencia en, al menos, alrededor de 60 %, y aun con mayor preferencia

en, al menos, alrededor de 80 % en relación con los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede ser evaluada en un sistema de modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede ser evaluada examinando la capacidad del compuesto para inhibir, tal 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 de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto en el arte sería capaz de determinar tales cantidades sobre la base de factores tales como la talla del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Una composición de la presente descripción puede ser administrada a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en el arte. Como apreciará 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 de la descripción incluyen las 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 inyección e infusión enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, entre otras, la administración endovenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural y intraesternal.

Alternativamente, un anticuerpo o porción que liga un antígeno de éste de la descripción puede ser administrado a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden ser preparados con vehículos que protegerán el compuesto contra una liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden usar polímeros, biocompatibles, biodegradables, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en el arte. Ver, por ejemplo, “Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems”, J.R. Robinson,

ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Usos y métodos de la descripción

Los anticuerpos, particularmente los anticuerpos humanos, las composiciones
5 de anticuerpos y los métodos de la presente descripción tienen numerosas utilidades
de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que comprenden el diagnóstico y el
tratamiento de trastornos mediados por Notch1. Por ejemplo, estas moléculas pueden
ser administradas a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por
ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una variedad de trastornos. Como
10 se usa en la presente, el término “sujeto” está previsto para incluir animales humanos
y no humanos. Los animales no humanos incluyen 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 Notch1. Los métodos son
15 particularmente adecuados para tratar a pacientes humanos que tienen un trastorno
asociado a la expresión o activación anormal de Notch1. Cuando se administran
anticuerpos a Notch1 junto con otro agente, los dos pueden ser administrados en
cualquier orden o simultáneamente.

Dada la ligadura específica de los anticuerpos de la descripción para Notch1,
20 los anticuerpos de la descripción se pueden usar para detectar específicamente la
expresión de Notch1 en la superficie de las células y, además, se pueden usar para
purificar el Notch1 a través de purificación por inmunoadfinidad.

Además, los anticuerpos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la
presente descripción se pueden usar para tratar a un sujeto con expresión anormal de
25 Notch1, por ejemplo, cáncer. En una forma de realización particular, el cáncer es
leucemia linfoblástica aguda de los linfocitos T (T-ALL). En otra forma de realización
particular, el cáncer es cáncer de pulmón de las células no pequeñas (NSCLC), cáncer
de mama, cáncer de colon o cáncer ovárico.

Otros tipos de expresión anormal de Notch 1 que se pueden tratar por los
30 anticuerpos de la descripción incluyen, por ejemplo, mesotelioma, hepatobiliar
(conducto hepático y biliar), un tumor del SNC primario o secundario, un tumor
cerebral primario o secundario, cáncer de pulmón (NSCLC y SCLC), cáncer óseo,
cáncer pancreático, cáncer de la piel, cáncer de la cabeza y el cuello, melanoma
cutáneo o intraocular, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago,
35 cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal, y duodenal), cáncer uterino, 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 del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de las partes blandas, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de las células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkin, tumores del eje de la columna vertebral, glioma del tallo cerebral, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de la vesícula, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los tipos de cáncer que anteceden.

Las vías adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la descripción *in vivo* e *in vitro* son conocidas en el arte y pueden ser seleccionadas por los expertos en el arte. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden ser administradas por inyección (por ejemplo, endovenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto, y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

Los anticuerpos humanos anti-Notch1 de la descripción pueden ser coadministrados con uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede ser ligado al agente (como un inmunocomplejo) o puede ser administrado en forma separada del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede ser administrado antes, después o en forma concurrente con el agente o puede ser coadministrado con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, por ejemplo, radiación. El anticuerpo y el agente pueden ser preparados para administración simultánea, secuencial o separada. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos, tales como docetaxel, doxorubicina (adriamicina), cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucil, y ciclofosfamida hidroxiaurea, los cuales, por sí solos, son eficaces solo a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino puede ser administrado de manera intravenosa como 100 mg/dosis una vez cada cuatro semanas, y adriamicina es

administrada de manera intravenosa como 60 a 75 mg/ml de dosis una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos humanos anti-Notch1 de la presente descripción con agentes quimioterapéuticos provee dos agentes contra el cáncer que operan a través de diferentes mecanismos que causan un efecto citotóxico a las
5 células tumorales humanas.

Kits

También dentro del alcance de la presente descripción están involucrados los kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la descripción (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o
10 inmunoconjugados) e instrucciones para el uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la descripción (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad
15 complementaria que se liga a un epítipo en el antígeno Notch1 distinto del primer anticuerpo humano).

Por consiguiente, a los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la descripción se les puede administrar adicionalmente (de manera anterior, simultánea o posterior a la administración de un anticuerpo humano de la descripción)
20 otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que intensifica o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

La presente descripción es ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deberían ser interpretados como limitativos. El contenido de todas las Figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citados en esta
25 solicitud se incorporan expresamente en la presente por referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Generación de inmunógenos de proteínas Notch1 humanas y de ratón recombinantes

30 A. Expresión y purificación de proteínas Notch1 NRR humanas y de ratón

Los constructos de ADNc que codifican la región Notch1 NRR, los aminoácidos de SEQ ID 2 para Notch1 humano y aminoácidos de SEQ ID 6 para Notch1 de ratón que se muestran en la Tabla 1, con un péptido señal en el terminal N, y marcadores Avi e His6 en el terminal C, son clonados en el vector de expresión pSMED2. Estos
35 constructos son transfectados transitoriamente en células COS o de ovario de hámster

chino (CHO), y las proteínas segregadas en medios acondicionados son analizadas en SDS-PAGE. Después de procesar en el sitio de escisión S1, las mitades terminal N ~26 kDa (LNR-A, B, C y HD1) y terminal C ~12 kDa (HD2 y marcador Avi_His) del dominio Notch1 NRR permanecen asociadas a través de interacciones no covalentes para formar un complejo heterodimérico, como se muestra en la **FIG. 1**. El procesamiento S1 del Notch1 NRR es determinado como de aproximadamente 50 % o menos en las muestras preparadas de células de CHO.

Para aumentar el procesamiento en el sitio de escisión S1, el constructo de expresión Notch1 NRR es transfectado a células CHO-PACE (Harrison et, al, Semin Hematol. 1998 Apr;35(2 Suppl 2):4-10), y se seleccionan líneas celulares estables con la mayor expresión y procesamiento completo de Notch1 NRR. El cultivo de estas líneas celulares es graduado hacia arriba para la recolección de medios acondicionados (CM) de los cuales se purifican las proteínas Notch1 NRR.

El CHO-PACE CM concentrado es cargado en una columna de Qiagen Ni-NTA Superflow de 27 ml que es equilibrada con PBS a un caudal de 1ml/min a 4 °C. Después de cargar, la columna es lavada con 10 Volúmenes de Columna (CV) de PBS, seguido por 10 CV de Tampón A (300 mM de NaCl, 50 mM de Na₂HPO₄, pH 8,0), y seguido por 10 CV de 4 % de Tampón B (500 mM de imidazol, 300 mM de NaCl, 50 mM de Na₂HPO₄, pH 8,0). El Notch1 Avi_His humano es eluido usando un gradiente lineal al 100 % de Tampón B sobre 10CV. Las fracciones que contienen Notch1 Avi_His humano son agrupadas, filtradas y dializadas para obtener PBS sin calcio ni magnesio (CMF). La proteína es purificada adicionalmente con dos rondas de cromatografía de exclusión de tamaño en un tándem de columnas Superdex-200 y Superdex-75 (total CV = 600 ml) equilibradas con TBS +1 mM de CaCl₂, 0,1 mM de ZnCl₂. El análisis SDS-PAGE de proteínas marcadoras Notch1 NRR_Avi_His humanas y de ratón purificadas muestra que > 90 % de la proteína purificada se escinde correctamente a los tamaños de péptidos del terminal N y del terminal C predichos de Notch1 NRR. El análisis de dispersión de luz (SEC-MAL) de las proteínas Notch1 NRR humanas y de ratón purificadas muestra un pico al peso molecular esperado de 40 kDa en una columna de exclusión de tamaño en condiciones nativas, lo que indica la formación adecuada de un heterodímero Notch1 NRR intacto.

B. Expresión y purificación de la proteína de fusión cyno-Notch1 NRR-Fc

Un constructo de ADNc que codifica la región cyno-Notch1 NRR, aminoácidos de SEQ ID 10 para cyno Notch1 se muestra en la **Tabla 1**, con un péptido señal en el

terminal N y un fragmento de IgG1 Fc humano en el terminal C, es clonado en el vector de expresión pSMED2. Este constructo es co-transfectado transitoriamente en 293 células (Invitrogen) con un constructo de sobreexpresión PACE soluble (Harrison et, al, Semin Hematol. 1998 Apr;35(2 Suppl 2):4-10) para asegurar el procesamiento completo de la región cyno-Notch1 NRR. El medio acondicionado es cosechado de células transfectadas, y la proteína de fusión cyno-Notch1 NRR-Fc es purificada a través de purificación de afinidad de la proteína A. Luego, la proteína purificada es dializada en TBS que contiene 1 mM de CaCl₂. El análisis SDS-PAGE muestra dos fragmentos de polipéptidos en los tamaños esperados de 12Kd (HD1) y 37Kd (HD2+Fc), con > 95 % de pureza de la preparación de proteína. El SEC analítico en condiciones nativas muestra un solo pico alrededor de 50K_D, que representa un heterodímero de los dos fragmentos descritos anteriormente, con una cantidad mínima de agregados (< 1 %) en la preparación.

La siguiente **Tabla 1** provee las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de regiones de Notch1 NRR humanas, de ratón y cyno.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de regiones Notch1 NRR humanas, de ratón y cyno.

SEQ ID NO:		
1	Secuencia de aminoácidos de Notch1 NRR (aminoácidos en el tipo de minúsculas representan la secuencia señal Gp1b y el marcador Avi_His)	mpIIIIIIlpsplhpGGAGRDIPPLIEEACELP ECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGG DCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDG HCDSQCNSAGCLFDGFDQCRAEGQC NPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAEC EWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVLM PPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFK RDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPKRA AEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGG RRRRELDPM DVRG SIVILEIDNRQCVQ ASSQCFQSATDVAAFLGALASLGLSNIP YKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMgggsgg glndifeaqkiewheggpphhhhh
2	Secuencia de aminoácidos de Notch1 NRR humanos	GGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGN KVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFND PWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSCN SAGCLFDGFDQCRAEGQCNPLYDQYC KDHFS DGHCDQGCNSAEC EWDGLDC AEHVPERLAAGTLVVVLM PPEQLRNS SFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQ MIFPYYGREEELRKHPKRAAEGWAAP DALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELD PMDVRG SIVYLEIDNRQCVQASSQCFQ

		SATDVAAFLGALASLGSLNIPYKIEAVQ SETVEPPPPAQLHFM
3	Secuencia de nucleótidos de Notch1 NRR humana (nucleótidos en el tipo de minúsculas representan la secuencia codificadora del péptido señal y el marcador Avi_His)	atgcctctcctcctcttgctgctcctgctgccaagcccctt acacgcgGGTGGGGCCGGGCGCGACA TCCCCCGCCGCTGATCGAGGAGGC GTGCGAGCTGCCCCGAGTGCCAGGAG GACGCGGGCAACAAGGTCTGCAGCC TGCAGTGCAACAACCACGCGTGCGG CTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTC AACTTCAATGACCCCTGGAAGAACTG CACGCAGTCTCTGCAGTGCTGGAAGT ACTTCAGTGACGGCCACTGTGACAGC CAGTGCAACTCAGCCGGCTGCCTCTT CGACGGCTTTGACTGCCAGCGTGCG GAAGGCCAGTGCAACCCCTGTACG ACCAGTACTGCAAGGACCACTTCAGC GACGGGCACTGCGACCAGGGCTGCA ACAGCGCGGAGTGCGAGTGGGACGG GCTGGACTGTGCGGAGCATGTACCC GAGAGGCTGGCGGCCGGCACGCTG GTGGTGGTGGTGTGTATGCCGCCGG AGCAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCAC TTCCTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGC TGCACACCAACGTGGTCTTCAAGCGT GACGCACACGGCCAGCAGATGATCTT CCCCTACTACGGCCGCGAGGAGGAG CTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTG CCGCCGAGGGCTGGGCCGACCTGA CGCCCTGCTGGGCCAGGTGAAGGCC TCGCTGCTCCCTGGTGGCAGCGAGG GTGGGCGGCGGCGGAGGGAGCTGG ACCCCATGGACGTCCGCGGCTCCAT CGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGC AGTGTGTGCAGGCCTCCTCGCAGTG CTTCCAGAGTGCCACCGACGTGGCC GCATTCTGGGAGCGCTCGCCTCGC TGGGCAGCCTCAACATCCCCTACAAG ATCGAGGCCGTGCAGAGTGAGACCG TGGAGCCGCCCCCGCCGGCGCAGCT GCACTTCATGggagggggaagcggaggcgg actgaacgacatcttcgaggctcagaaatcgaatgg cacgaagggtggcccaccacatcatcatcatcac
4	Secuencia de nucleótidos de Notch1 NRR humanas	GGTGGGGCCGGGCGCGACATCCCCC CGCCGCTGATCGAGGAGGCGTGCGA GCTGCCCCGAGTGCCAGGAGGACGCG GGCAACAAGGTCTGCAGCCTGCAGT GCAACAACCACGCGTGCGGCTGGGA CGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTTCA ATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCA GTCTCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCA GTGACGGCCACTGTGACAGCCAGTG CAACTCAGCCGGCTGCCTCTTCGACG

		GCTTTGACTGCCAGCGTGCGGAAGG CCAGTGCAACCCCCTGTACGACCAGT ACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGG GCACTGCGACCAGGGCTGCAACAGC GCGGAGTGCGAGTGGGACGGGCTG GACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGA GGCTGGCGGCCCGGCACGCTGGTGGT GGTGGTGCTGATGCCGCCGGAGCAG CTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTCCT GCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCAC ACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGC ACACGGCCAGCAGATGATCTTCCCCT ACTACGGCCGCGAGGAGGAGCTGCG CAAGCACCCCATCAAGCGTGCCGCC GAGGGCTGGGCCGCACTGACGCC TGCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCT GCTCCCTGGTGGCAGCGAGGGTGGG CGGCGGCGGAGGGAGCTGGACCCC ATGGACGTCCGCGGCTCCATCGTCTA CCTGGAGATTGACAACCGGCAGTGT GTGCAGGCCTCCTCGCAGTGCTTCCA GAGTGCCACCGACGTGGCCGCATTC CTGGGAGCGCTCGCCTCGCTGGGCA GCCTCAACATCCCCTACAAGATCGAG GCCGTGCAGAGTGAGACCGTGGAGC CGCCCCCGCCGGCGCAGCTGCACTT CATG
5	Secuencia de aminoácidos de ratón Notch1 NRR (aminoácidos en tipo de letra minúscula representan la secuencia señal Gp1b y Avi_His tag de proteína purificada)	mpIIIIIIlpsplhpGGAGRDIPPPQIEEACEL PECQVDAGNKVCNLQCNNHACGWDG GDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSD GHCDSQCNSAGCLFDGFDCLTEGQC NPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAEC EWDGLDCAEHVPERLAAGTLVLVLLP PDQLRNNSFHFLRELSHVLHTNVVFKR DAQGQQMIFPYYGHEEELRKHPIKRST VGWATSSLLPGTSGGRQRRELDPMI RGSIVILEIDNRQCVQSSSQCFQSATDV AAFLGALASLGS LNIPYKIEAVKSEPVE PPLPSQLHLMggggsgggIndifeaqkiewhegg pphhhhhh
6	Secuencia de aminoácidos de Notch1 NRR de ratón	GGAGRDIPPPQIEEACELPECQVDAGN KVCNLQCNNHACGWDGGDCSLNFND PWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSQCN SAGCLFDGFDCLTEGQCNP LYDQYC KDHFS DGHCDQGCNSAEC EWDGLDC AEHVPERLAAGTLVLVLLPPDQLRNN SFHFLRELSHVLHTNVVFKRDAQGQQ MIFPYYGHEEELRKHPIKRSTVGWATS SLLPGTSGGRQRRELDPMDIRGSIVYL EIDNRQCVQSSSQCFQSATDVAAFLGA LASLGS LNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQL HLM

7	Secuencia de nucleótidos de Notch1 NRR de ratón (los nucleótidos en el tipo de minúsculas representan la secuencia señal Gp1b y el marcador Avi_His de la proteína purificada)	atgcctctcctcctcttctgctgctcctgctgccaagcccctt acacgcgGGTGGCGCTGGGCGCGACAT TCCCCACCGCAGATTGAGGAGGCC TGTGAGCTGCCTGAGTGCCAGGTGG ATGCAGGCAATAAGGTCTGCAACCTG CAGTGTAAATAATCACGCATGTGGCTG GGATGGTGGCGACTGCTCCCTCAACT TCAATGACCCCTGGAAGAACTGCACG CAGTCTCTACAGTGCTGGAAGTATTT TAGCGACGGCCACTGTGACAGCCAG TGCAACTCGGCCGGCTGCCTCTTTGA TGGCTTCGACTGCCAGCTCACCGAG GGACAGTGCAACCCCTGTATGACCA GTACTGCAAGGACCACTTCAGTGATG GCCACTGCGACCAGGGCTGTAACAG TGCCGAATGTGAGTGGGATGGCCTA GACTGTGCTGAGCATGTACCCGAGC GGCTGGCAGCCGGCACCCCTGGTGCT GGTGGTGCTGCTTCCACCCGACCAG CTACGGAACAACCTCCTTCCACTTTCT GCGGGAGCTCAGCCACGTGCTGCAC ACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGATGC GCAAGGCCAGCAGATGATCTTCCCGT ACTATGGCCACGAGGAAGAGCTGCG CAAGCACCCAATCAAGCGCTCTACAG TGGGTTGGGCCACCTCTTCACTGCTT CCTGGTACCAGTGGTGGGCGCCAGC GCAGGGAGCTGGACCCCATGGACAT CCGTGGCTCCATTGTCTACCTGGAGA TCGACAACCGGCAATGTGTGCAGTCA TCCTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCAC CGATGTGGCTGCCTTCCCTAGGTGCTC TTGCGTCACTTGGCAGCCTCAATATT CCTTACAAGATTGAGGCCGTGAAGAG TGAGCCGGTGGAGCCTCCGCTGCCC TCGCAGCTGCACCTCATGggagggggaa gcgaggcgactgaacgacatcttcgaggctcaga aaatcgaatggcacgaaggtggcccaccacatcatc atcatcatcac
8	Secuencia de nucleótidos de Notch1 NRR de ratón	GGTGGCGCTGGGCGCGACATTCCCC CACCGCAGATTGAGGAGGCCTGTGA GCTGCCTGAGTGCCAGGTGGATGCA GGCAATAAGGTCTGCAACCTGCAGTG TAATAATCACGCATGTGGCTGGGATG GTGGCGACTGCTCCCTCAACTTCAAT GACCCCTGGAAGAACTGCACGCAGT CTCTACAGTGCTGGAAGTATTTTAGC GACGGCCACTGTGACAGCCAGTGCA ACTCGGCCGGCTGCCTCTTTGATGGC TTCGACTGCCAGCTCACCGAGGGAC AGTGCAACCCCTGTATGACCAGTAC TGCAAGGACCACTTCAGTGATGGCCA

		CTGCGACCAGGGCTGTAACAGTGCC GAATGTGAGTGGGATGGCCTAGACT GTGCTGAGCATGTACCCGAGCGGCT GGCAGCCGGCACCCTGGTGCTGGTG GTGCTGCTTCCACCCGACCAGCTACG GAACAACCTCCTTCCACTTTCTGCGGG AGCTCAGCCACGTGCTGCACACCAAC GTGGTCTTCAAGCGTGATGCGCAAG GCCAGCAGATGATCTTCCCGTACTAT GGCCACGAGGAAGAGCTGCGCAAGC ACCCAATCAAGCGCTCTACAGTGGGT TGGGCCACCTCTTCACTGCTTCTGG TACCAGTGGTGGGCGCCAGCGCAGG GAGCTGGACCCCATGGACATCCGTG GCTCCATTGTCTACCTGGAGATCGAC AACCGGCAATGTGTGCAGTCATCCTC GCAGTGCTTCCAGAGTGCCACCGAT GTGGCTGCCTTCTAGGTGCTCTTGC GTCACCTGGCAGCCTCAATATTCCTT ACAAGATTGAGGCCGTGAAGAGTGA GCCGGTGGAGCCTCCGCTGCCCTCG CAGCTGCACCTCATG
9	Secuencia de aminoácidos Cyno-Notch1 NRR-Fc (los aminoácidos en el tipo de minúsculas representan la secuencia señal y el fragmento hIgG1 Fc de la proteína purificada)	mgwscilflvatatgahsGGAGRDIPPLIEEA CELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACG WDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWK YFSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDCQRA EGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGC NSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLV VVVLMPEQLRNSSFHFLRELSRVLHT NVVFKRDAHGQQMIFPYYGREEELRK HPIKRAAEGWAAPEALLGQVKASLLPG GGGGGRRRRELDPMDVRRSIVILEIDN RQCVQASSQCFQSATDVAAFLGALASL GSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFM ggggsggggepkssdkthtcppcpapellggpsvflf ppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvd gvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngke ykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsre emtknqvsltlclvkgyfypsdiavewesngqpennykt tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslspsgk
10	Secuencia de aminoácidos Cyno-Notch1 NRR	GGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGN KVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFND PWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDQN SAGCLFDGFDCQRAEGQCNPLYDQYC KDHFSFGHCDQGCNSAECEWDGLDC AEHVPERLAAGTLVVVLMPEQLRNS SFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQ MIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAP EALLGQVKASLLPGGGGGGRRRRELD PMDVRRSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQ SATDVAAFLGALASLGS LNIPYKIEAVQ

		SETVEPPPPAQLHFM
11	Secuencia de nucleótidos Cyno-Notch1 NRR-Fc (nucleótidos en el tipo de minúsculas representan la secuencia señal y el fragmento hlg1 Fc de la proteína purificada)	atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaaca gctacagggcgcgactccGGTGGGGCCGGG CGCGACATCCCCCGCCGCTGATCG AGGAGGCGTGCGAGCTGCCCCGAGTG CCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTC TGCAGCCTGCAGTGCAACAACCACG CGTGCGGCTGGGACGGCGGTGACTG CTCCCTCAACTTCAATGACCCCTGGA AGAACTGCACGCAGTCTCTGCAGTGC TGGAAGTACTTCAGTGACGGCCACTG TGACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGC TGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGCCA GCGTGCGGAAGGCCAGTGCAACCCC CTGTACGACCAGTACTGCAAGGACCA CTTCAGCGACGGGCACTGCGACCAG GGCTGCAACAGCGCGGAGTGCGAGT GGGACGGGCTGGACTGTGCGGAGCA TGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCGGC ACGCTGGTGGTGGTGGTGTGATGC CGCCGGAGCAGCTGCGCAACAGCTC CTTCCACTTCCTGCGGGAGCTCAGCC GCGTGCTGCACACCAACGTGGTCTTC AAGCGTGACGCACACGGCCAGCAGA TGATCTTCCCCTACTACGGCCGCGAG GAGGAGCTGCGCAAGCACCCCATCA AGCGTGCCGCCGAGGGCTGGGCCG CACCTGAAGCCCTGCTGGGCCAGGT GAAGGCCTCGCTGCTCCCTGGTGGC GGTGGAGGTGGGCGGCGGCGGAGG GAGCTGGACCCCATGGACGTCCGCG GCTCCATCGTCTACCTGGAGATTGAC AACCGGCAGTGTGTGCAGGCCTCCT CGCAGTGCTTCCAGAGTGCCACCGA CGTGGCCGCATTCTGCGGAGCGCTC GCCTCGCTGGGCAGCCTCAACATCC CCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAG TGAGACCGTGGAGCCGCCCCGCGG GCGCAGCTGCACTTCATGggagggggcg gatccggcgaggcgagagcccaatcttctgaca aaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaact cctggggggaccgtcagttctcttcccccaaaac ccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggt cacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacc tgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgaggag gtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagca gtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc gtcctgcaccaggactggtgaatggcaaggagtac aagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc atcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcgagcc ccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccg ggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct

		gcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtg gagtgggagagcaatgggcagccggagaacaacta caagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcc ttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc atgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtccccgggtaaa
12	Secuencia de nucleótidos Cyno- Notch1 NRR	GGTGGGGCCGGGCGCGACATCCCCC CGCCGCTGATCGAGGAGGCGTGCGA GCTGCCCCGAGTGCCAGGAGGACGCG GGCAACAAGGTCTGCAGCCTGCAGT GCAACAACCACGCGTGCGGCTGGGA CGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTTCA ATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCA GTCTCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCA GTGACGGCCACTGTGACAGCCAGTG CAACTCAGCCGGCTGCCTCTTCGACG GCTTTGACTGCCAGCGTGCGGAAGG CCAGTGCAACCCCCTGTACGACCACT ACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGG GCACTGCGACCAGGGCTGCAACAGC GCGGAGTGCGAGTGGGACGGGCTG GACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGA GGCTGGCGGCCCGGCACGCTGGTGGT GGTGGTGCTGATGCCGCCGGAGCAG CTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTCCT GCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCAC ACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGC ACACGGCCAGCAGATGATCTTCCCCT ACTACGGCCGCGAGGAGGAGCTGCG CAAGCACCCCATCAAGCGTGCCGCC GAGGGCTGGGCCGACCTGAAGCCC TGCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCT GCTCCCTGGTGGCGGTGGAGGTGGG CGGCGGCGGAGGGAGCTGGACCCC ATGGACGTCCGCGGCTCCATCGTCTA CCTGGAGATTGACAACCGGCAGTGT GTGCAGGCCTCCTCGCAGTGCTTCCA GAGTGCCACCGACGTGGCCGCATTC CTGGGAGCGCTCGCCTCGCTGGGCA GCCTCAACATCCCCTACAAGATCGAG GCCGTGCAGAGTGAGACCGTGGAGC CGCCCCCGCCGGCGCAGCTGCACTT CATG

Ejemplo 2

Generación, clonación y humanización de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 de rata

A. Inmunización y generación de un hibridoma

- 5 Los inmunógenos humanos y de ratón descritos en el Ejemplo 1 son coinyectados en ratas Sprague-Dawley para la generación de hibridomas. Las ratas

Sprague-Dawley son inmunizadas por inyecciones subcutáneas de una mezcla que contiene 20 µg cada uno de proteínas recombinantes Notch1 NRR_Avi_His humanas y de ratón en adyuvante completo de Freund. Las inmunizaciones son repetidas a intervalos de 2 semanas durante 12 semanas. Las muestras de suero recogidas los
5 días 0, 35, 49, y 63 después de la primera inyección son evaluadas para determinar la actividad del título de anticuerpos anti-Notch1 circulantes por el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), como se describe más abajo.

Cuando se alcanzan títulos óptimos, se inyecta una dosis final de la mezcla de proteína de manera intravenosa (vena de la cola) en una rata que tiene un título de
10 anticuerpos óptimo 4 días antes que sea sacrificada para la recolección de los esplenocitos. Los esplenocitos totales (2×10^8) de la rata son fusionados con la línea celular de mieloma de ratón P3X63.Ag8.653 ($2,5 \times 10^7$) usando PEG 4000. Las células fusionadas son colocadas en placas 96 cavidades (0,2 ml/cavidad) y sometidas a selección HAT (RPMI 1640 conteniendo 5×10^{-4} M de hipoxantina, $1,6$
15 $\times 10^{-5}$ M de timidina, 4×10^{-4} M aminopterina y 20 % de FCS inactivado por calor).

Catorce días después de la fusión, los sobrenadantes de hibridoma se cosecharon y evaluaron para determinar la presencia de IgG de rata que exhiben actividad ligante a la proteína recombinante Notch1 NRR humana y/o de ratón, y
20 Notch1 de longitud completa expresado en la superficie de las células U-2 OS por ELISA, como se describe más adelante. Los sobrenadantes que muestran actividad ligante a los objetivos Notch1 son evaluados adicionalmente para determinar su capacidad para bloquear la actividad de señalización mediada por Notch1 en un ensayo de gen informante, como se describe más adelante. Los clones de bloqueo de
25 señalización Notch1 seleccionados son subclonados luego para realizar análisis adicionales.

B. Rastreo y selección de anticuerpos específicos Notch1

1. ELISA de ligadura de proteínas recombinantes

30 Los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma son evaluados, en primer lugar, mediante análisis para determinar la ligadura a inmunógenos humanos y de ratón recombinantes por ELISA. Proteínas purificadas Notch1 NRR_Avi_His tag humanas o de ratón recombinantes son recubiertas en placas de ELISA de 96 cavidades CoStar hi-bound en 100 µl de PBS con Mg/Ca a una concentración de 1 µg/ml durante la
35 noche. Las placas son lavadas con PBS-Mg/Ca y bloqueadas durante 1 hora con 1%

de BSA en PBS-Mg/Ca. La solución de bloqueo es decantada de la placa, y los sobrenadantes del cultivo de hibridoma son aplicados a la placa. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, las placas se lavan nuevamente con PBS-Mg/Ca antes de aplicar el anticuerpo secundario HRP-conjugado diluido
5 (1:20,000) en tampón de bloqueo. Cuando el anticuerpo primario testeado es IgG de rata, el anticuerpo secundario es IgG Fc anti-rata de cabra (Betil Biotech); y cuando el anticuerpo primario es IgG de ratón, el anticuerpo secundario es IgG Fc anti-ratón de cabra (Thermal Scientific).

Después de 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario, las placas se
10 lavaron nuevamente como se describió anteriormente, y se agrega la solución de sustrato TMB. La reacción de desarrollo se deja en reposo durante 10 minutos antes de agregar la solución de detención, 0,18M H₂SO₄. Se mide la absorbancia a O. D. 450 nM, y los datos son representados gráficamente y analizados con Microsoft Excel y el software Graphpad-Prism. Los anticuerpos que exhiben actividad ligante a Notch1
15 NRR humano y/o de ratón son seleccionados para ELISA basado en células adicional, como se describe más adelante.

2. ELISA basado en células

Los sobrenadantes de clones que despliegan ligadura positiva a inmunógenos
20 en ELISA basados en Notch1 NRR recombinantes descritos anteriormente, luego, son evaluados mediante análisis para determinar la ligadura de Notch1 a la superficie celular en un ELISA basado en células. Las células U-2 OS que sobreexpresan en forma estable la proteína Notch1 de longitud completa humana o de ratón en la superficie celular son colocadas en placas a 50.000 células/cavidad en placas de 96
25 cavidades (opacas blancas, BD/VWR) el día antes del ensayo ELISA. El día del ELISA, el medio de cultivo se retiró de las cavidades y se diluyó en soluciones de anticuerpos en forma seriada (1:3 en tampón de bloqueo), o se aplicaron sobrenadantes de cultivo de hibridoma a la placa. Las placas son incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas antes de ser lavadas con PBS-Mg/Ca. Luego,
30 el anticuerpo secundario HRP-conjugado es aplicado e incubado con células durante 1 hora como se describió anteriormente para el ELISA de proteína recombinante. Las placas son lavadas con PBS-Mg/Ca antes de ser desarrolladas con el kit de desarrollo Pico-Chemiluminescent (Thermal Scientific), y las mediciones de quimioluminiscencia son realizadas según las instrucciones del fabricante. La representación gráfica de los
35 datos y los análisis se realizan con Microsoft Excel y el software Graphpad-Prism.

Estos datos se usan para evaluar mediante análisis los clones de hibridoma y la caracterización de los anticuerpos parentales de rata y humanizados, como se describe en los Ejemplos que se encuentran a continuación.

5 3. Ensayos de genes informantes

Luego, los sobrenadantes de clones que presentan una ligación positiva a inmunógenos se evalúan mediante análisis para determinar la actividad de neutralización en ensayos de cocultivo de gen informante Notch humano y de ratón (RGA). Los resultados del análisis se utilizan para seleccionar clones primarios.

10 Se tripsinizan unas células informantes Notch1 humanas, se las cosecha a partir de placas de cultivo en un medio completo McCoy's 5A (McCoy's 5A con FBS al 10 % y penicilina, estreptomicina, Invitrogen), y se las cuenta. Se preparan diluciones adecuadas de células con el mismo medio para obtener 3.000 células/cavidad en un volumen total de 80 µl/cavidad en una placa de cultivo de 96 cavidades (blanca opaco,
15 BD/VWR), en presencia de soluciones de anticuerpo diluidas en serie (1:3 en medio completo de McCoy's 5A) o de sobrenadantes de cultivos de hibridoma. Las mezclas de células y diluciones de anticuerpos se incuban sobre las placas en una incubadora de cultivos de células (37°C, 5% CO₂) durante 1 h antes de añadirse 15.000/cavidad de células DLL4-HEK293 humanas en cada cavidad. Después de la adición de las
20 células hDLL4-HEK293, las placas se someten a incubación ulterior durante 20 h en la incubadora, y se utiliza el sistema de ensayo de Dual-Glo Luciferasa (Promega) para medir la luciferasa de luciérnaga y la actividad de la luciferasa de *Renilla* de control de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se grafican los datos y se los analiza mediante Microsoft Excel y software Graphpad-Prism. Se lleva a cabo el ensayo de
25 cocultivo del gen informante de Notch1 de ratón como se describe para el ensayo de cocultivo del gen informante de Notch1 humano, con la salvedad de que se cocultivan 20.000 células/cavidad de células informantes Notch1 de ratón junto con 40.000 células/cavidad de células DLL4-HEK293 de ratón.

30 C. Clonación y secuenciado

Los clones primarios con ligación de superficie celular o con actividades neutralizantes confirmadas son subclonados, por ejemplo, los clones 438 y 351 como se describe más adelante en la presente. Se extraen los ARN de los subclones, y se obtienen las secuencias de ADN de región variable de los anticuerpos expresados,
35 mediante la clonación RT-PCR, como se describe más adelante.

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 RNaseasy 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 lambda) 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

SEQ ID NO:		
13	Secuencia de aminoácidos de la	AVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCTASGFT

	región variable de la cadena pesada 438	FSSFAMAWVRQAPTKGLEWVASISYGGA DTYYRDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMDS LRSEDSTYYCAKDLPHYGYTPFVMDAW GQGTSTVSS
14	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada 438	GCGGTACAGTTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCTTG AAACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCA CTTTCAGTAGCTTTGCAATGGCCTGGGT CCGCCAGGCTCCAACGAAGGGGCTGG AGTGGGTGCGCATCCATTAGTTATGGTG GTGCTGACACTTACTATCGAGACTCCGT GAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGA TAATGCAAAAAGCAGCCTATATTTGCAA ATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACG TCCACTTATTACTGTGCAAAAAGACCTTC CATACTACGGATATACCCCCTTTGTTAT GGATGCCTGGGGTCAGGGAACCTCAGT CACTGTCTCCTCA
15	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada 438 Kabat	SFAMA
16	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada 438 Chothia	GFTFSSFAMA
17	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada 438 Kabat	TCCTTCGCCATGGCC
18	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada 438 Chothia	GGATTCACCTTTAGTTCCTTCGCCATGG CC
19	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada 438 Kabat	SISYGGADTYRDSVKG
20	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada 438 Chothia	SYGGAD
21	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada 438 Kabat	TCCATCTCCTATGGAGGCGCTGACACC TACTACCGGGACTCCGTGAAGGGC
22	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada 438 Chothia	CCTATGGAGGCGCTGAC
23	Secuencia de aminoácidos CDR3 de la región variable de la	DLPYYGYTPFVMDA

	cadena pesada 438 Kabat y Chothia	
24	Secuencia de nucleótidos CDR3 de la región variable de la cadena pesada 438 Kabat y Chothia	GATCTGCCCTACTACGGCTACACCCCC TTCGTGATGGACGCC
25	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana 438	DIMLTQSPPTLSVTPGETISLSCRASQRIN TDLHWYQQKPNESPRVLIK FASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYC QQSNSWPYTFGAGTKLELK
26	Secuencia de nucleótidos de la de la región variable de la cadena liviana 438	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCACCTA CCCTGTCTGTA ACTCCAGGAGAGACCA TCAGTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GAATTAACACTGACTTACATTGGTATCA GCAAAAACCAAATGAGTCTCCAAGGGTT CTCATCAAATTTGCTTCCCAGACCATCT CTGGAGTCCCCTCCAGGTT CAGTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAA TATTAACAGAGTAGAGCCTGAAGATTTT TCAGTTTATTACTGTCAACAGAGTAATA GCTGGCCATACACGTTTGGCGCTGGGA CCAAGCTGGA ACTGAAA
27	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena liviana 438 Kabat y Chothia	RASQRINTDLH
28	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena liviana 438 Kabat y Chothia	CGGGCCTCCCAGCGGATCAACACCGAC CTGCAC
29	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena liviana 438 Kabat y Chothia	FASQTIS
30	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena liviana 438 Kabat y Chothia	TTCGCCAGCCAGACCATCTCC
31	Secuencia de aminoácidos CDR3 de la región variable de la cadena liviana 438 Kabat y Chothia	QQSNSWPYT
32	Secuencia de nucleótidos CDR3 de la región variable de la cadena liviana 438 Kabat y Chothia	CAGCAGTCCAACTCCTGGCCCTACACC
33	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada 351	EVQLVESGGGLVQPGRSLKVSCLASGFT FSHYGMNWIRQAPGKGLDWVASISRSGS YIRYVDTVKGRFTVSRDI AKNTLYLQMTSL RSED TALYYCAREGQFGDYFEYWGGV MVTVSS
34	Secuencia de nucleótidos de la	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGG

	región variable de la cadena pesada 351	AGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCT GAAAGTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATT ACTTTCAGTCACTATGGAATGAACTGGA TTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GACTGGGTTGCATCTATTAGTAGGAGT GGCAGTTACATCCGCTATGTAGACACA GTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGA GACATTGCCAAGAACACCCTGTACCTG CAAATGACCAGTCTGAGGTCTGAAGAC ACTGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGAGG GACAATTCGGGGACTACTTTGAGTACTG GGGCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTC CTCA
35	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada 351 Kabat	HYGMN
36	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada 351 Chothia	GFTFSHYGMN
37	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada 351 Kabat	CACTATGGAATGAAC
38	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada 351 Chothia	GGATTCACCTTTCAGTCACTATGGAATGA AC
39	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada 351 Kabat	SISRSGSYIRYVDTVKG
40	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada 351 Chothia	SRSGSY
41	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada 351 Kabat	TCTATTAGTAGGAGTGGCAGTTACATCC GCTATGTAGACACAGTGAAGGGC
42	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada 351 Chothia	AGTAGGAGTGGCAGTTAC
43	Secuencia de aminoácidos CDR3 de la región variable de la cadena pesada 351 Kabat y Chothia	EGQFGDYFEY
44	Secuencia de nucleótidos CDR3 de la región variable de la cadena pesada 351	GAGGGACAATTCGGGGACTACTTTGAG TAC

	Kabat y Chothia	
45	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana 351	DIMLTQSPATLSVTPGERISLSCRASQKIS TNLHWYQQKPNESPRILIKYASQTISGIPS RFSGSGSGTDFTLHINTVEPEDFSVYYCQ QTNSWPLTFGSGTKLEIK
46	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana 351	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTA CCCTGTCTGTAACTCCAGGAGAGAGAA TCAGTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA AAATTAGCACTAACTTACATTGGTATCA GCAAAAGCCAAATGAGTCTCCAAGGATT CTCATCAAATATGCTTCCCAGACCATCT CTGGAATCCCCTCCAGGTTTCAGTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCC ATATTAACACAGTAGAGCCTGAAGATTT TTCAGTTTATTACTGTCAACAGACTAATA GTTGGCCGCTCACGTTCCGTTCTGGGA CCAAGCTGGAGATCAAG
47	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena liviana 351 Kabat y Chothia	RASQKISTNLH
48	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena liviana 351 Kabat y Chothia	AGGGCCAGTCAGAAAATTAGCACTAACT TACAT
49	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena liviana 351 Kabat y Chothia	YASQTIS
50	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena liviana 351 Kabat y Chothia	TATGCTTCCCAGACCATCTCT
51	Secuencia de aminoácidos CDR3 de la región variable de la cadena liviana 351 Kabat y Chothia	QQTNSWPLT
52	Secuencia de nucleótidos CDR3 de la región variable de la cadena liviana 351 Kabat y Chothia	CAACAGACTAATAGTTGGCCGCTCACG
53	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (CDR de Kabat subrayada) 90	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFT FSHYGVNWIRQAPGKGLEWIASISRSSSY IYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQLTSLR SEDALYYCAREGQFGDYFEYWGRGVM VTSS
54	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada 90	GAGGTGCAGCTAGTGGAGTCTGGAGGA GGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTG AACTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATTCA CTTTCAGTCACTATGGAGTGAAGTGGAT TCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AATGGATTGCATCTATTAGTAGAAGTAG

		CAGTTACATCTACTATGCAGACACAGTG AAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGAC AATGCCAAGAACACCCTGTTCTGCAAT TGACCAGTCTGAGGTCTGAAGACACTG CCTTGATTACTGTGCAAGAGAGGGGC AATTCGGGGACTACTTTGAATACTGGG GCCGAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCT CA
55	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (CDR de Kabat subrayada) 90	DIILTQSPAALSVTPGESISLSCRASQSINT <u>NLHWYQQKPNESPRVLIKYASQTISGIPS</u> RFSGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYCQ <u>QNSNWPLTFGSGTKLEIK</u>
56	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana 90	GACATCATACTGACTCAGTCTCCAGCTG CCCTGTCTGTAAGTCCAGGAGAGAGCA TCAGTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTATTAACACTAACTTGCATTGGTATCA GCAAAAACCAAATGAGTCTCCAAGGGTT CTCATCAAATATGCTTCCCAGACCATCT CTGGAATCCCCTCCAGGTTTCAGTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAA TATTAACAGAGTAGAGCCTGAAGATTTT TCAGTTTATTACTGTCAACAGAGTAATA GCTGGCCGCTCACGTTCCGTTCTGGGA CCAAGCTGGAGATCAAA
57	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (CDR de Kabat subrayada) 132	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFT F <u>SHYGMNWIRQAPGKGLEWITSITSSSSY</u> <u>IYYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLR</u> SEDALYYCAREGQFGDYFDYWGGQVM VTSS
58	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada 132	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGG AGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCT GAAACTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATTC ACTTTCAGTCACTATGGAATGAACTGGA TTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGATTACATCTATTACTAGTAGTA GCAGTTACATCTACTATGCAGACACAGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCA AATGACCAGTCTGAGGTCTGAAGACAC TGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGAGGG GCAATTCGGGGACTACTTTGATTACTGG GGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCC TCA
59	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (CDR de Kabat subrayada) 132	DIMLTQSPATLSVTPGESISLSCRASQSIN <u>TNLHWYQQKPNESPRVLIKYASQTISGIP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYC</u> <u>QNSNWPLTFGSGTKLEIK</u>
60	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana 132	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTA CCCTGTCTGTAAGTCCAGGAGAGAGCA TCAGTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTATTAACACTAACTTACATTGGTATCA GCAAAAACCAAATGAGTCTCCAAGGGTT

		CTCATCAAATATGCTTCCCAGACCATCT CTGGAATCCCCTCCAGGTTCAAGTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAA TATTAACAGAGTAGAGCCTGAAGATTTT TCAGTTTATTACTGTCAACAGAGTAATA GCTGGCCGCTCACGTTCTGGTTCTGGGA CCAAGCTGGAGATCAAA
61	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (CDR de Kabat subrayada) 132_A12	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFT FS <u>HYGMN</u> WIRQAPGKGLEWITSITSSSSY <u>IYYADTVKGRFT</u> ISRDNKNTLYLQMTSLR SEDTALYYCARE <u>GQFGDYFDY</u> WGQGV MTVSS
62	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada 132_A12	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGG AGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCT GAAACTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATTC ACTTTCAGTCACTATGGAATGAACTGGA TTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGATTACATCTATTACTAGTAGTA GCAGTTACATCTACTATGCAGACACAGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCA AATGACCAGTCTGAGGTCTGAAGACAC TGCCTTGATTACTGTGCAAGAGAGGG GCAATTCGGGGACTACTTTGATTACTGG GGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCC TCA
63	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (CDR de Kabat subrayada) 132_G11	DIMLTQSPATLSVTPGESISLSCRASQSIN <u>TNLHWYQQKPNESPRVLIKYASQTIS</u> GIP SRFSGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYC <u>QQSNSWPLTF</u> SGSTKLEIK
64	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana 132_G11	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTA CCCTGTCTGTAAGTCCAGGAGAGAGCA TCAGTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTATTAACACTAACTTACATTGGTATCA GCAAAAACCAATGAGTCTCCAAGGGTT CTCATCAAATATGCTTCCCAGACCATCT CTGGAATCCCCTCCAGGTTCAAGTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAA TATTAACAGAGTAGAGCCTGAAGATTTT TCAGTTTATTACTGTCAACAGAGTAATA GCTGGCCGCTCACGTTCTGGTTCTGGGA CCAAGCTGGAGATCAAA
65	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (CDR de Kabat subrayada) 137	QVQVKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFS LT <u>SYHVS</u> WVRQPPGKGLEWMGAIW <u>TGG</u> <u>STAYNSLLKSRL</u> SISRDISKSQVFLKMNSL QTEDTATYYCAR <u>ADFYVMDAW</u> GQGASV TVSS
66	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada 137	CAGGTGCAGGTGAAGGAGTCAGGACCT GGTCTGGTGCAGCCCTCACAGACTTTG TCTCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCT CACTAACCAGCTATCATGTAAGCTGGGT TCGCCAGCCTCCAGGAAAAGGTCTGGA

		GTGGATGGGAGCAATATGGACTGGTGG AAGCACAGCATATAATTCACCTTCTCAAA TCCCGACTGAGCATCAGCAGGGACATC TCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGA ACAGTCTGCAAACCTGAAGACACAGCCA CTTACTACTGTGCCAGAGCCGATTTCTA TGTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAGC TTCAGTCACTGTCTCCTCA
67	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (CDR de Kabat subrayada) 137	<u>DIMLTQSPVTLSPGESISLSCRASQ</u> <u>ISITDLHWYQQKPNESPRVLIKYGSQTISG</u> <u>IPSRFSGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYC</u> <u>QQSNSWPWTFGGGTKLELK</u>
68	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana 137	ACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGTTAC CCTGTCTGTGTCTCCAGGAGAGAGCAT CAGTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAG TATTAGCACTGACTTGCATTGGTATCAG CAAAAACCAAATGAGTCTCCAAGGGTTC TCATCAAATATGGTTCCAGACCATCTC TGGAATCCCCTCCAGGTTCAAGTGGCAG TGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAAT ATTAACAGAGTAGAGCCTGAAGATTTTT CAGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAATAG CTGGCCATGGACATTCGGTGGAGGCAC CAAGCTGGAATTGAAA

D. Humanización 438 de rata y 351 de rata

Se humanizan 438 de rata y 351 de rata, y se desarrollan posteriormente, a fin de obtener anticuerpos monoclonales humanizados 438 y 351 (en adelante, “438 humanizado” y “351 humanizado”, respectivamente). Una región constante de la cadena pesada IgG1 humano con 3 mutaciones en la región bisagra inferior (L234A/L235A/G237A) que desactivan las funciones efectoras del hlgG1 y una región constante de la cadena liviana kappa humana se utilizan como la región constante para los anticuerpos 438 humanizados y 351 humanizados. La humanización de las regiones variables 438 de rata y 351 de rata se lleva a cabo mediante la estrategia de injerto de CDR.

La **Tabla 3** proporciona las secuencias nucleicas y de aminoácidos de varias regiones de las variantes de 438 humanizado y 351 humanizado. Después de las pruebas, se determina que la variante 438 humanizada inicial es VH1.1/VL1.8. VH1.1/VL1.8 438 humanizada tiene una cadena pesada variable, como se establece en SEQ ID NO: 71 y una cadena liviana variable como se establece en SEQ ID NO: 97. Para las variantes 438 humanizadas, las regiones CDR para las variantes VH 1.0 y 1.1 son iguales, y las regiones CDR para las variantes VL 1.0, 1.1, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 1.10 y 1.11 son iguales. Se determina que la variante 351 humanizada

inicial es VH1.0/VL1.1 después de las pruebas. VH1.0/VL1.1 351 humanizada tiene una cadena pesada variable como se establece en SEQ ID NO: 115 y una cadena liviana variable como se establece en SEQ ID NO: 129. Para las variantes 351 humanizadas, las regiones de CDR para las variantes VL 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, y 1.7 son las mismas.

Tabla 3: secuencias 438 y 351 humanizadas

SEQ ID NO:		
69	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 438	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGA DTYYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDLPYYGYTPFVMDA WGQGTLLTVSS
70	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 438	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCCTCCATCTCCTATGG AGGCGCTGACACCTACTACCGGGACTC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAT CTGCCCTACTACGGCTACACCCCTTC GTGATGGACGCCTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA
71	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH 1.1) 438	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGA DTYYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDL PYYGYTPFVMDA WGQGTLLTVSS
72	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCCTCCATCTCCTATGG AGGCGCTGACACCTACTACCGGGACTC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAGGAT CTGCCCTACTACGGCTACACCCCTTC GTGATGGACGCCTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA
73	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena	SFAMA

	pesada (VH1.1) 438 Kabat	
74	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Chothia	GFTFSSFAMA
75	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Kabat	TCCTTCGCCATGGCC
76	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Chothia	GGATTACCTTTAGTTCCTTCGCCATGG CC
77	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Kabat	SISYGGADTYRDSVKG
78	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Chothia	SYGGAD
79	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Kabat	TCCATCTCCTATGGAGGCGCTGACACC TACTACCGGGACTCCGTGAAGGGC
80	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Chothia	CCTATGGAGGCGCTGAC
81	Secuencia de aminoácidos CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Kabat y Chothia	DLPYYGYTPFVMDA
82	Secuencia de nucleótidos CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH1.1) 438 Kabat y Chothia	GATCTGCCCTACTACGGCTACACCCCC TTCGTGATGGACGCC
83	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.0) 438	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRI NTDLHWYQQKPGKAPKLLIYFASQTISGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSNSWPYTFGQGTKLEIK
84	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.0) 438	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCGCTCCAGC GGATCAACACCGACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGC TCCTGATCTATTTGCGCCAGCCAGACCAT CTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGG CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATT TTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTCCAA

		CTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCAGGG GACCAAGCTGGAGATCAAA
85	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 438	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRIN TDLHWYQQKPGKAPKVLIFASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSNSWPYTFGQGKLEIK
86	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 438	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCC TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAG CGGATCAACACCGACCTGCACTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG GTGCTGATCAAGTTCGCCAGCCAGACC ATCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCACT GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGT CCAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCC AGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
87	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.3) 438	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRIN TDLHWYQQKPGKAPKLLIYFASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSNSWPYTFGQGKLEIK
88	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.3) 438	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCC TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAG CGGATCAACACCGACCTGCACTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG CTCCTGATCTATTTTCGCCAGCCAGACCA TCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCACTG GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTC CAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
89	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.4) 438	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRI NTDLHWYQQKPGKAPKVLIFASQTISGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSNSWPYTFGQGKLEIK
90	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.4) 438	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGC GGATCAACACCGACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGG TGCTGATCTATTTTCGCCAGCCAGACCAT CTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGG CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATT TTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTCCAA CTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCAGGG GACCAAGCTGGAGATCAAA
91	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRI NTDLHWYQQKPGKAPKLLIFASQTISGV

	liviana (VL1.5) 438	PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSNSWPYTFGQGTKLEIK
92	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.5) 438	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGC GGATCAACACCGACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGC TCCTGATCAAGTTCGCCAGCCAGACCA TCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTG GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTC CAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
93	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.6) 438	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRIN TDLHWYQQKPGKAPKVLIIYFASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC CQQSNSWPYTFGQGTKLEIK
94	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.6) 438	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCC TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAG CGGATCAACACCGACCTGCACTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAG GTGCTGATCTATTTTCGCCAGCCAGACC ATCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGT CCAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCC AGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
95	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.7) 438	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRIN TDLHWYQQKPGKAPKLLIKFASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC CQQSNSWPYTFGQGTKLEIK
96	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.7) 438	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCC TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAG CGGATCAACACCGACCTGCACTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAG CTCCTGATCAAGTTCGCCAGCCAGACC ATCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGT CCAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCC AGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
97	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.8) 438	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQRI NTDLHWYQQKPGKAPKVLIIKIFASQTISGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSNSWPYTFGQGTKLEIK
98	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG

	liviana (VL1.8) 438	TCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGC GGATCAACACCGACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGG TGCTGATCAAGTTCGCCAGCCAGACCA TCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGT GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTC CAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
99	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena liviana (VL1.8) 438 Kabat y Chothia	RASQRINTDLH
100	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena liviana (VL1.8) 438 Kabat y Chothia	CGGGCCTCCCAGCGGATCAACACCGAC CTGCAC
101	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena liviana (VL1.8) 438 Kabat y Chothia	FASQTIS
102	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena liviana (VL1.8) 438 Kabat y Chothia	TTCGCCAGCCAGACCATCTCC
103	Secuencia de aminoácidos CDR3 de la región variable de la cadena liviana (VL1.8) 438 Kabat y Chothia	QQSNSWPYT
104	Secuencia de nucleótidos CDR3 de la región variable de la cadena liviana (VL1.8) 438 Kabat y Chothia	CAGCAGTCCAACCTCTGGCCCTACACC
105	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.9) 438	DIMLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRIN TDLHWYQQKPGKAPKVLIFASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSNSWPYTFGGGTKLEIK
106	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.9)	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGC GGATCAACACCGACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGG TGCTGATCAAGTTCGCCAGCCAGACCA TCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGT GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTC CAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
107	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRIN TDLHWYQQKPGKAPRVLIKFASTISGVP

	liviana (VL1.10) 438	SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSNSWPYTFGQGKLEIK
108	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.10) 438	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCTCCCAGC GGATCAACACCGACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAGGG TGCTGATCAAGTTCGCCAGCCAGACCA TCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGT GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTC CAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
109	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.11) 438	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQRI NTDLHWYQQKPGKAPRVLIKFASTISGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSNSWPYTFGQGKLEIK
110	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.11) 438	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCTCCCAGC GGATCAACACCGACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAGGG TGCTGATCAAGTTCGCCAGCCAGACCA TCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGT GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTC CAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
111	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH1.1)-hlgG1- 3M (CDR subrayadas) 438	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <u>FSSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGG</u> <u>ADTYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKDL</u> PYYGYTPFVMDA WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH1.1)-hlgG1- 3M 438	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCCTCCATCTCCTATGG

		AGGCGCTGACACCTACTACCGGGACTC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAGGAT CTGCCCTACTACGGCTACACCCCCTTC GTGATGGACGCCTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTIONTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG TGCCCAGCACCTGAAGCCGCTGGGGCA CCGTCACTCTTCTCTTCCCCCCTAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCC GGGTAAA
113	Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana (VL1.8)-hkappa (CDR subrayadas) 438	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRI NTDLHWYQQKPGKAPKVLIFASQTISGV PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQNSWPTYFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG

		LSSPVTKSFNRGEC
114	Secuencia de nucleótidos de la cadena liviana (VL1.8)-hkappa 438	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCTCCCAGC GGATCAACACCGACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAGGG TGCTGATCAAGTTCGCCAGCCAGACCA TCTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGT GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGTC CAACTCCTGGCCCTACACCTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAC TGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG ATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGT
115	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSHYGMNWVRQAPGKGLEWVASISRSG SYIRYVDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREGQFGDYFEYWGQ GTLVTVSS
116	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGTCACTACGGCATGAACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCCTCCATCTCCAGATC CGGCTCCTACATCAGATACGTGGACAC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAG GGCCAGTTCGGCGACTACTTCGAGTAC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA
117	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351 Kabat	HYGMN
118	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351 Chothia	GFTFSHYGMN

119	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351 Kabat	CACTATGGAATGAAC
120	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351 Chothia	GGATTCACTTTTCAGTCACTATGGAATGAAC
121	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351 Kabat	SISRSGSYIRYVDTVKG
122	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351 Chothia	SRSGSY
123	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada (VH1.0) 351 Kabat	TCTATTAGTAGGAGTGGCAGTTACATCCGCTATGTAGACACAGTGAAGGGC
124	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena pesada (VH 1.0) 351 Chothia	AGTAGGAGTGGCAGTTAC
125	Secuencia de aminoácidos CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH 1.0) Kabat y Chothia	EGQFGDYFEY
126	Secuencia de nucleótidos CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH 1.0) 351 Kabat y Chothia	GAGGGACAATTCGGGGACTACTTTGAGTAC
127	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.0) 351	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKI STNLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQTISGV PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQTNSWPLTFGGGTKVEIK
128	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.0) 351	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGA AGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCT CCTGATCTATTACGCCTCTCAGACCATC TCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAACTTACTACTGTGAGCAGACCAAC TCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
129	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 351	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKI STNLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGV PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQTNSWPLTFGGGTKVEIK

130	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 351	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCTCCCAGA AGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGAT CCTGATCAAGTACGCCTCTCAGACCATC TCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAACTTACTACTGTGAGCAGACCAAC TCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
131	Secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 351 Kabat y Chothia	RASQKISTNLH
132	Secuencia de nucleótidos CDR1 de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 351 Kabat y Chothia	AGGGCCAGTCAGAAAATTAGCACTAACT TACAT
133	Secuencia de aminoácidos CDR2 de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 351 Kabat y Chothia	YASQTIS
134	Secuencia de nucleótidos CDR2 de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 351 Kabat y Chothia	TATGCTTCCCAGACCATCTCT
135	Secuencia de aminoácidos CDR3 de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 351 Kabat y Chothia	QQTNSWPLTT
136	Secuencia de nucleótidos CDR3 de la región variable de la cadena liviana (VL1.1) 351 Kabat y Chothia	CAACAGACTAATAGTTGGCCGCTCACG
137	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.2) 351	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIS TNLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQTISGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QQTNSWPLTFGGGTKVEIK
138	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.2) 351	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCC TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTACCATCACTTGCCGGGCTCCCAG AAGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATTACGCCTCTCAGACCAT CTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGG CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATT TTGCAACTTACTACTGTGAGCAGACCAA CTCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGG

		GACCAAGGTGGAGATCAAA
139	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.3) 351	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKI STNLHWYQQKPGKAPKILYYASQTISGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQTNSWPLTFGGGKVEIK
140	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.3) 351	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGA AGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGAT CCTGATCTATTACGCCTCTCAGACCATC TCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAACTTACTACTGTCAGCAGACCAAC TCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
141	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.4) 351	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKI STNLHWYQQKPGKAPKLLIKYASQTISGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQTNSWPLTFGGGKVEIK
142	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.4) 351	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGA AGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCT CCTGATCAAGTACGCCTCTCAGACCATC TCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAACTTACTACTGTCAGCAGACCAAC TCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
143	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.5) 351	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIS TNLHWYQQKPGKAPKILYYASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQTNSWPLTFGGGKVEIK
144	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.5) 351	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCC TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAG AAGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGA TCCTGATCTATTACGCCTCTCAGACCAT CTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGG CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATT TTGCAACTTACTACTGTCAGCAGACCAA CTCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGG GACCAAGGTGGAGATCAAA
145	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.6) 351	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQKIS TNLHWYQQKPGKAPKLLIKYASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

		QQTNSWPLTFGGGKVEIK
146	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.6) 351	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCC TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAG AAGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGC TCCTGATCAAGTACGCCTCTCAGACCAT CTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGG CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATT TTGCAACTTACTACTGTCAGCAGACCAA CTCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGG GACCAAGGTGGAGATCAAA
147	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.7) 351	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIS TNLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQTNSWPLTFGGGKVEIK
148	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana (VL1.7) 351	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCC TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCCTCCCAG AAGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGA TCCTGATCAAGTACGCCTCTCAGACCAT CTCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGG CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATT TTGCAACTTACTACTGTCAGCAGACCAA CTCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGG GACCAAGGTGGAGATCAAA
149	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH1.0)-hlgG1-3M (CDR subrayadas) 351	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT F <u>SHYGMNWVRQAPGKGLEWVASISRS</u> <u>SYIRYVDTVKGRFTISR</u> DNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARE <u>GQFGDYFEYWGQ</u> GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPEPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFP SCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
150	Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH1.0)-hlgG1-3M 351	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGTCACTACGGCATGAACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCCTCCATCTCCAGATC CGGCTCCTACATCAGATACGTGGACAC

		CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAG GGCCAGTTCGGCGACTACTTCGAGTAC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA
151	Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana (VL1.1)-hkappa (CDR subrayadas) 351	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKI <u>STNLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGV</u> PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY <u>CQQTNSWPLTFGGG</u> TKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
152	Secuencia de nucleótidos de la cadena liviana (VL1.1)-hkappa 351	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCTCCCAGA AGATCTCCACCAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGAT CCTGATCAAGTACGCCTCTCAGACCATC TCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAACTTACTACTGTGACGACACCAAC TCCTGGCCCCTGACCTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA

Los ADNc que contienen armazón aceptor humano, DP54 para cadena pesada y DPK9 para cadena pesada, con secuencias donantes de CDr relevantes, son sintetizados por GeneArt, AG. Los productos de ADNc sintetizados son subclonados y fusionados en marco con la región constante IgG1-3m humano para la cadena pesada, o kappa humano para la cadena liviana en vectores de expresión pSMED2 y pSMN2, respectivamente. En la **Tabla 4**, que se encuentra más adelante, se muestra la alineación de VH y VL del armazón aceptor humano, las variantes 438 humanizadas y 438 de rata, y las variantes 351 humanizadas y 351 de rata. Las CDR del esquema de Kabat están subrayadas. Para 351VH y 351VL, el texto en minúscula en la región de marco indica la diferencia en los residuos entre las variantes 351 humanizadas y 351 de rata.

Existe una homología significativa entre el armazón aceptor humano y el de la región variable 438 de rata, 78 % para VH y 61 % para VL. Asimismo, existe una homología considerable entre el armazón aceptor humano y las regiones variables de 351 de rata, 76% para VH y 61% para VL.

Tabla 4: Alineación de armazón aceptor humano, variantes 438 humanizadas y 438 de rata, junto con las variantes 351 humanizadas y 351 de rata. (las CDR del esquema de Kabat están subrayadas)

438VH:		
DP54_JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SSYWMWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY 80
Rat438VH	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFS	SSFAMAWVRQAPTKGLEWVASISYGGADTYRDSVKGRFTISRDNAKSSLY 80
438VH1.0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADTYRDSVKGRFTISRDNAKNSLY 80
438VH1.1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADTYRDSVKGRFTISRDNAKNSLY 80
DP54_JH4	LQMNSLRAEDTAVYYCAR---	YFDY-----WGQGTILTVSS 113
Rat438VH	LQMDSLRS EDTSTYYCAKDL	PYYGYTPFVMDAWGQGTSVTVSS 123
438VH1.0	LQMNSLRAEDTAVYYCARDL	PYYGYTPFVMDAWGQGTILTVSS 123
438VH1.1	LQMNSLRAEDTAVYYCAKDL	PYYGYTPFVMDAWGQGTILTVSS 123
438VL:		
DPK9_Jk2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL	NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP 80
Rat438VL	DIMLTQSPPTLSVTPGETISLSCRASQRINTDL	HWYQQKPNESPRVLIKFASQTISGVPSRFSGSGSGTDFTLNINRVEP 80
438VL1.0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRINTDL	HWYQQKPGKAPKLLIYFASQTISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP 80
438VL1.8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRINTDL	HWYQQKPGKAPKLLIKFASQTISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP 80
DPK9_Jk2	EDFATYYCQ	QSYSTPYTFGQGTKLEIK 107
Rat438VL	EDFSVYYCQ	QSNWPYTFGAGTKLEIK 107
438VL1.0	EDFATYYCQ	QSNWPYTFGQGTKLEIK 107
438VL1.8	EDFATYYCQ	QSNWPYTFGQGTKLEIK 107
351VH:		
DP54_JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLrLSCaASGFTFS	SYWMWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY 80
Rat351VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCLASGFTFS	HYGMNWIRQAPGKGLDWVASISRSGSYIRYVDTVKGRTVSRDIANKNTLY 80
351VH1.0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	HYGMNWVRQAPGKGLEWVASISRSGSYIRYVDTVKGRTISRDNAKNSLY 80
DP54_JH4	LQMnSLRaEDTAVYYCAR-----	YFDYWGQGTILTVSS 113
Rat351VH	LQMnSLRSED TALYYCAR	EGQFGDYFEYWGQGMVTVSS 119
351VH1.0	LQMNSLRAEDTAVYYCAR	EGQFGDYFEYWGQGTILTVSS 119
351VL:		
DPK9_Jk4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL	NWYQQKPGkAPkLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP 80
Rat351VL	DIMLTQSPATLSVTPGERISLSC	RASQKISTNLHWYQQKPNESPRILIKYASQTISGIPSRFSGSGSGTDFTLHINTVEP 80
351VL1.0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKISTNLH	WYQQKPGKAPKLLIYASQTISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP 80
351VL1.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKISTNLH	WYQQKPGKAPKILIKYASQTISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP 80
DPK9_Jk4	EDFatYYCQ	QSYSTPLTFGgGTVKEIK 107
Rat351VL	EDFSVYYCQ	QOTNSWPLTFGSGTKLEIK 107
351VL1.0	EDFATYYCQ	QOTNSWPLTFGGGTVKEIK 107
351VL1.1	EDFATYYCQ	QOTNSWPLTFGGGTVKEIK 107

5

Durante la humanización, los anticuerpos por injerto de CRD pueden resultar en una pérdida de actividad del anticuerpo original. Las diferencias en la región de armazón pueden explicar la conformación alterada de anticuerpos 438 humanizados y 351 humanizados resultantes y las retromutaciones seleccionadas en el armazón aceptor humano al anticuerpo original se incorporan a fin de recuperar la actividad y el epítope de ligación. En la **Tabla 5**, se muestran las retromutaciones seleccionadas en

10

el armazón aceptor humano a los residuos 438 y 351 de rata en las posiciones correspondientes para optimizar la actividad y el epítipo de ligación.

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

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

Ejemplo 3

Caracterización de anticuerpos inhibidores de Anti-Notch

A. Expresión y ligación a Notch1

Se ensayan los rendimientos de expresión relativos de las variantes 438 y 351 humanizadas en un ensayo de expresión transitorio en células 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 significativos de más de 30 µg/ml.

Tabla 6. Rendimiento de expresión relativa en medios condicionados de variantes 438 y 351 humanizadas en la expresión transitoria en células 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/ 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

recubren placas de cultivo de 96 cavidades con proteína Notch1 NRR-Avi_His (placas co-Star de alta unión) o se recubren con células U-2 OS que expresan Notch1 de longitud completa (placas para cultivo celular, Co-star), respectivamente. A la placa se aplican soluciones de anticuerpo (1:3 en tampón de bloqueo) diluidas en serie o medio
5 acondicionado de cultivo celular, en la presencia de 0,8 nM de anticuerpo 438 de rata biotinilado o anticuerpo 351 de rata biotinilado.

Después de la incubación durante 2 horas, se lavan las placas, como se describió anteriormente, y se aplica estreptavidina conjugada con HRP (Southern Biotech) diluida 1:5000 en tampón de bloqueo. Se permite la incubación con
10 estreptavidina durante 30 min antes de lavar las placas nuevamente, y se desarrolla con solución TMB durante 10 minutos. Se detiene la reacción de desarrollo mediante la adición de H_2SO_4 0,18 M, y se mide la absorbancia a 450 nM. La representación de los datos y los análisis se realizan con Microsoft Excel y software Graphpad-Prism.

En la Tabla 8 se muestran los valores EC_{50} (nM) de ELISA de competición de
15 las variantes 438 humanizadas con el anticuerpo 438 de rata biotinilada para la ligación al inmunógeno NRR de Notch1 humano recombinante. Los datos muestran que múltiples variantes de 438 humanizado, inclusive 438 VH1.1/VL1.8 humanizado, tienen valores de EC_{50} similares a los de 438 de rata no etiquetada en el ELISA de competición. Esto demuestra que las variantes 438 humanizadas compiten al igual que
20 438 de rata no etiquetada con 438 de rata biotinilada para la unión al inmunógeno de NRR de Notch1. Estos resultados indican que las variantes 438 humanizadas se ligan al mismo epítipo o a un epítipo similar en el inmunógeno que el anticuerpo 438 de rata.

En la Tabla 8 también se muestran los valores EC_{50} (nM) de ELISA de
25 competición de las variantes 438 humanizadas con el anticuerpo 438 de rata biotinilada para la ligación al Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular de las células U-2 OS. Los datos muestran que múltiples variantes de 438 humanizado, inclusive 438 VH1.1/VL1.8 humanizado, tienen valores de EC_{50} similares a los de 438 de rata no etiquetada en el ELISA de competición. Esto
30 demuestra que las variantes 438 humanizadas compiten al igual que 438 de rata no etiquetada con 438 de rata biotinilada para la unión al Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular de las células U-2 OS. Estos resultados indican que las variantes 438 humanizadas se ligan al mismo epítipo o a un epítipo similar en el Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular
35 de las células U-2 OS que el anticuerpo 438 de rata.

Tabla 8: Valores de EC₅₀ (nM) de ELISA de competición ELISA entre variantes 438 humanizadas y 438 de rata biotinilada en Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular o recombinante.

Anticuerpo	438- mIgG de rata	VH1.0 /VL1.1	VH1.1 /VL1.0	VH1.1 /VL1.1	VH1.1 /VL1.3	VH1.1 /VL1.9	VH1.0 /VL1.8	VH1.1 /VL1.8	VH1.1 /VL1.5	438- hIgG de rata
Notch1 humano recombinante	1,5	0,7	1,1	0,6	2,5	0,4	2,1	1,2	7,0	2,1
Notch1 humano de longitud completa en superficie celular	3,6	4,0	2,8	2,4	2,8	2,2	11,6	3,2	3,3	4,4

5

En la Tabla 9 se muestran los valores EC₅₀ (nM) de ELISA de competición de las variantes 351 humanizadas y el anticuerpo 351 de rata biotinilada para la ligación al Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular de las células U-2 OS. Los datos muestran que múltiples variantes de 351 humanizado, inclusive 351 VH1.0/VL1.1 humanizado, tienen valores de EC₅₀ similares a los de 351 de rata no etiquetada en el ELISA de competición. Esto demuestra que las variantes 351 humanizadas compiten al igual que 351 de rata no etiquetada con 351 de rata biotinilada para la unión al Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular de las células U-2 OS. Estos resultados indican que las variantes 351 humanizadas se ligan al mismo epítipo o a un epítipo similar en el Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular de las células U-2 OS que el anticuerpo 351 de rata.

Tabla 9: Valores de EC₅₀ (nM) de ELISA de competición ELISA entre variantes 351 humanizadas y 351 de rata biotinilada en Notch1 humano de longitud completa expresado en la superficie celular.

Anticuerpo	351 de rata	VH1.0 /VL1.1	VH1.0 /VL1.4	Anti-E. Tenella
Notch1 humano de longitud completa en superficie celular	4,3	2,75	2,11	No competición

C. Carácter específico de la ligación a otros homólogos de Notch humano

Otros miembros de la familia del receptor de Notch desempeñan roles importantes en los procesos biológicos. Por ejemplo, la deficiencia en Notch2 genera la muerte embrionaria en los modelos de ratón. En cambio, la deficiencia en Notch3 genera solamente fenotipo moderado en las arterias distales, y la deficiencia de Notch4 no produce fenotipos detectables en modelos de ratón. Los homólogos más

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).

IC50 (nM)	Notch1 NRR-Fc de humano	Notch1 NRR-Fc de ratón	Notch1 NRR-Fc de Cynomolgus	Notch2 NRR-Fc de humano	Notch3 NRR-Fc de humano	Notch3 NRR-Fc de ratón
351 VH1.0/VL1.1 humanizado	0.249	0.27	0.26	N/B	N/B	N/B

D. Afinidad de ligación con Notch1 NRR humano

Se determinan las constantes cinéticas de las interacciones anti-Notch1 NRR mediante resonancia plasmónica superficial (Biacore® T100, Biacore Inc., Piscataway, NJ). Se inmovilizan células de flujo de un chip CM5 con aproximadamente 10.000 unidades de resonancia (RU) de IgG-Fc anti-humano (Biacore®) en 10 mM de glicina, pH 5,0 a 10 µl/min durante 600 segundos. Se capturan 10 µg/ml de variantes 438 y 351 humanizadas anti-Notch1 diluidas en TBS con 1mM de CaCl₂ a 10 µl/min. La asociación de cuatro concentraciones de proteína recombinante Notch1 NRR_Avi_His humana (de 3.7-100nM) y una concentración cero (tampón de corrida) a 100 µl/min se registran durante 3 minutos en TBS con 1 mM de CaCl₂. Se mide la disociación de los complejos durante 10 minutos. Se regenera la superficie del chip mediante la inyección de MgCl₂ 3M con 3 mM de EGTA durante 60 segundos a 10 µl/min. Las curvas obtenidas después de la sustracción de las señales de referencia y de tampón son ajustadas a un modelo de ligación de Langmuir 1:1 con un software Biacore® T100 Evaluation (Biacore®).

La afinidad de ligación de variantes 438 y 351 humanizadas seleccionadas y de anticuerpo A2 (Wu, Y. et al., Nature 464:1052-1057, 2010) con respecto a la proteína Notch1 NRR humana se muestra en la Tabla 12. El análisis cinético mediante Biacore muestra coeficientes ka (on) y kd (off) similares para las variantes 438 humanizadas seleccionadas, inclusive VH1.1/VL1.8 y VH1.1/VL1.3, en comparación con el anticuerpo A2.

El análisis cinético mediante Biacore también muestra mayores coeficientes ka (on) y kd (off) para variantes 351 de rata y 351 humanizadas seleccionadas, inclusive VH1.0/VL1.1 y VH1.1/VL1.4, en comparación con el anticuerpo A2. Si bien los valores de K_D resultantes para las variantes 351 de rata y 351 humanizadas seleccionadas son similares, las diferencias demostradas en los coeficientes ka (on) y kd (off) pueden desempeñar un rol en las distintas actividades neutralizantes contra la señalización dependiente del Notch1, como se describe en los siguientes Ejemplos.

Tabla 12. Análisis Biacore de variantes 438 de rata y 438 humanizadas junto con variantes 351 de rata y 351 humanizadas con respecto a la proteína Notch1 NRR humana, en comparación con el anticuerpo A2 de control (N/A representa “no

aplicable”).

438	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	K _D (nM)	Veces de diferencia con respecto a 438 de rata
438-hlG1 de rata	5,27E+04	2,29E-4	4,34E-09	4,34	1,00
438 VH1.1/VL1.3	2,42E+05	4,42E-04	1,83E-09	1,83	0,42
438 VH1.1/VL1.8	2,14E+05	4,49E-04	2,10E-09	2,10	0,48
438 VH1.0/VL1.1	6,05E+04	3,89E-04	6,42E-09	6,4	1,47
438 VH1.1/VL1.0	4,74E+04	1,03E-03	2,18E-08	21,8	5,02
438 VH1.1/VL1.1	4,37E+04	4,22E-04	9,65E-09	9,6	2,21
351	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	K _D (nM)	Veces de diferencia con respecto a 351 de rata
351 de rata	4,39E+05	1,02E-03	2,33E-09	2,3	1.00
351 V H1.0/VL1.1	4,92E+05	1,55E-03	3,14E-09	3,1	1.35
351 VH1.0/VL1.4	4,58E+05	2,23E-03	4,88E-09	4,9	2.10
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	K _D (nM)	
A2	1,20E+05	3,53E-04	2,94E-09	2,94	N/A

D. Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de una proteína o dominio de proteína se correlaciona positivamente con la estabilidad de la proteína o dominio de proteína. Los puntos de fusión más altos de una proteína o dominio de proteína, usualmente se provee una mejor capacidad de fabricación y una vida media más prolongada. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se usó para evaluar la estabilidad térmica de las variantes 438 humanizadas y 438-mlgG1 de rata. Las muestras de proteína se diluyeron en PBS a 0,3 mg/ml en un volumen de 250 µl. Se usó el blanco de tampón de formulación correspondiente para la muestra de referencia. Ambas muestras se desgasificaron rigurosamente usando un desgasificador de muestras y termostato MicroCal ThermoVac (Microcal, Inc., Northampton, MA) fijado a 8 °C. Las muestras se suministraron en las células apropiadas de un MicroCal VP-DSC Capillary Cell MicroCalorimeter (MicroCal, Inc., Northampton, MA). Las muestras se equilibraron durante 4 minutos a 15 °C y luego se escanearon hasta 100 °C a una velocidad de 100 °C por hora. Se seleccionó un período de filtrado de 20 segundos. Los datos sin procesar se corrigieron con la línea de base, y se normalizó la concentración de proteína. Se usó Origin Software (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para ajustar los datos a un modelo MN2-State Model con un número apropiado de transiciones.

Como se muestra en la siguiente Tabla 13, todas las variantes 438 humanizadas 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-mlgG1 de rata.

Tabla 13: Análisis de la estabilidad térmica (DSC) de variantes 438 humanizadas y

438-mIgG1 de rata.

	Tm (°C)			ΔT Fab
	CH2	Fab	CH3	
438-mIgG1 de rata	71,82		81,92	—
VH1.0/VL1.8	75,33		84,65	3,5
VH1.0/VL1.1	73,28	77,34	84,59	5,5
VH1.1/VL1.8	72,90	79,26	85,50	7,4
VH1.1/VL1.1	72,96	80,79	85,84	9,0
VH1.1/VL1.5	71,91	80,97	86,21	9,2
VH1.1/VL1.0	72,79	82,90		11,1
VH1.1/VH1.3	72,84	84,00		12,2

Ejemplo 4

Identificación de epítopes de ligación a anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en Notch 1

5 NRR

A. Constructos quiméricos de intercambio de dominio

Como se describe en el Ejemplo 3, las variantes 438 y 351 humanizadas carecen de reactividad cruzada con la proteína Notch3. Se preparan constructos quiméricos de intercambio de dominio para Notch1 y Notch3 NRR para el mapeo de epítopes de los anticuerpos anti-Notch1 438-mIgG1 de rata, 351-mIgG1 de rata y A2. Los constructos de expresión que codifican quimeras de intercambio de dominio de la región NRR de Notch3-Notch1 humano (denominados en la presente Notch 3-1) con la fusión Fc del terminal C (fragmento de IgG1 Fc humano) se transfectan individualmente en CHO-PACE, y se establecen recolecciones estables que expresan cada quimera. Los medios acondicionados de cada recolección estable se aplican a cromatografía de afinidad a la proteína A, seguido por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la purificación de la proteína de fusión quimérica. Luego, los preparados purificados se someten a diálisis en TBS con 1 mM de CaCl₂ y se los analiza en SEC analítica. La **Figura 2** muestra constructos quiméricos de intercambio de dominio de Notch1 NRR y Notch3 NRR humanos recombinantes para el mapeo de epítopes de 351-mIgG1 de rata, 438-mIgG1 de rata y A2. Como se muestra en la **Figura 2**, las proteínas quiméricas NRR recombinantes consisten en varios dominios Nocht3 (mostrados en gris) y Notch1 (mostrados en negro) fusionados a Fc humano (no se muestra).

Las capacidades de ligación relativas de 438-mIgG1 de rata y 351-mIgG1 de rata con las quimeras de intercambio de dominio Notch 3-1 NRR se ensayan con tecnología SPR Biacore® y las unidades de resonancia (RU) relativa representan la capacidad de ligación del anticuerpo sometido a ensayo. La ligación de 438-mIgG1 de rata y 351-mIgG1 de rata a las quimeras Notch 3-1 NRR mediante SPR se determina mediante resonancia plasmónica superficial (Biacore® 3000, BIAcore Inc., Piscataway,

NJ). Las células de flujo de un chip CM5 se inmovilizaron con aproximadamente 10.000 RU cada uno de IgG (cabra) anti-murino e IgG de cabra como control en 10 mM de glicina, pH 5,0 a 10 µl/min durante 600 segundos. Los anticuerpos 438-mlgG1 de rata y 351-mlgG1 de rata diluidos a 1 µg/ml en HBS-P con 0,1 mM de CaCl₂ son capturados a 10 µl/min durante 300 segundos. La captura aproximada para cada anticuerpo es de 150 RU (respuesta 1). Luego, se inyectan 10 µg/ml de quimeras Notch 3-1 NRR a 10 µl/ml durante 300 segundos en el mismo tampón en los anticuerpos capturados 438-mlgG1 de rata y 351-mlgG1 de rata, y se mide el Notch 3-1 NRR capturado (respuesta 2). Se logra la disociación de los complejos después de cada ciclo mediante 10 mM de Ac, pH 1,5 a 30 µl/min durante 20 segundos.

Como se muestra en la **Figura 2**, el perfil de ligación del epítipo del 438-mlgG1 de rata y 351-mlgG1 de rata con respecto a los dominios de Notch1 NRR es diferente del perfil de ligación de A2 a los dominios de Notch1 NRR. Más específicamente, la ligación de A2 con el NRR depende más del dominio LNR-B que 438-mlgG1 de rata. Además, la ligación de 351-mlgG1 de rata al Notch1 NRR depende menos de los dominios LNR-A y LNR-B en comparación con A2. Las diferencias en los perfiles de ligación del dominio, en combinación con información más detallada sobre las diferencias en los residuos de contacto en Notch1 NRR, y la diferente orientación de Notch1 NRR en asociación con 438-mlgG1 de rata y A2, como lo indican las estructuras cocrystalinas descritas más adelante, muestran que 438-mlgG1 de rata interactúa con Notch1 NRR de manera diferente a A2.

B. Análisis cristalográfico mediante rayos X

438 de rata y 351 de rata se expresan y purifican como se describió anteriormente en el Ejemplo 2. El Fab (fragmento de ligación al antígeno) se genera de 438 de rata y 351 de rata usando el kit Pierce Fab Preparation Kit (papaína inmovilizada), producto N.º 44685. Se incuban 438 de rata y 351 de rata con papaína inmovilizada durante 24 horas a 37 °C. Se purifica el Fab desalinizando con una columna Zeba (Pierce) equilibrada con 50 mM de Tris, pH 8,0. Se recolecta el Fab en el flujo pasante de la columna Q FF equilibrada con 50 mM de Tris, pH 8,0.

Se mezcla el fragmento Fab resultante con la proteína Notch1 NRR humana en una relación molar de 1:1,2 con la adición de 0,9 mM de CaCl₂ y se incubaba en hielo durante 30 minutos antes de purificación en una columna de exclusión por tamaño S200 equilibrada con 25 mM de Tris, pH 8,0, 150 mM de NaCl y 0,9 mM de CaCl₂. Se reúnen las fracciones del pico predominante que contienen el complejo Fab:NRR y se

las concentra a 11 mg/ml mediante un concentrador Vivaspin HY con límite 10 K_D. Se cristaliza el complejo Fab:NRR mediante el método de difusión de vapor por goteo.

Para 438 de rata, se requiere proteólisis limitada del complejo usando quimiotripsina a fin de obtener cristales. Primero, se mezcla el complejo con
5 quimiotripsina hasta una concentración final de 2 ug/ml y luego se combina con el mismo volumen de una solución de cavidad que consiste en 100 mM de cacodilato de sodio, pH 5,5, 14-20 % de PEG 8000, 100-200 mM de acetato de calcio. Los cristales aparecieron dentro de una semana y continuaron creciendo durante 3 semanas. Para 351 de rata, el complejo se combina el complejo con el mismo volumen de una
10 solución de cavidad que consiste en 20 % de PEG 3350, 200 mM de sulfato de sodio. Los cristales aparecieron después de una semana y continuaron creciendo durante 3 semanas.

Se crioprotegen los cristales barriendo la solución de cavidades con la adición de glicerol al 25%. Se reúnen los datos de rayos X en SER-CAT beamline 22BM para
15 438 de rata y 22ID para 351 de rata en el Advanced Photon Source y se procesan hasta una resolución de 2.6 Angstrom mediante el paquete de software HKL-2000 (HKL Software). Se resuelve la estructura mediante reemplazo molecular por medio de software Phaser. Los modelos de búsqueda se toman de pdb id 3L95 para Notch1 NRR, 2HRP para la cadena pesada y 1xgp para la cadena liviana de 438 de rata, y
20 1BM3 para la cadena pesada y 3L95 para la cadena liviana de 351 de rata. Se reconstruye el modelo resultante y se lo refina mediante coot y BUSTER (Global Phasing, Ltd.) incluyendo restricciones suaves de NCS. Se valida la estructura mediante molprobidad. Los residuos que intervienen en las interacciones se determinan mediante pymol y PISA.

En la Figura 3 se muestra una vista estructural del epítipo de 438 de rata en Notch1 NRR humano, y en la Figura 4 se muestra el epítipo de 351 de rata en Notch1 NRR humano. Se completa un análisis cristalográfico de rayos X similar mediante
25 datos publicados para el anticuerpo A2. En la Figura 5 se muestra la vista estructural del epítipo A2 en Notch1 NRR humano. Para las Figuras 3-5, se muestran en negro los residuos de aminoácidos dentro de 3,8 Angstrom del anticuerpo. En la siguiente
30 Tabla 14 se proveen los residuos que intervienen en las interacciones del anticuerpo Notch1 NRR para 438 de rata, 351 de rata y A2.

Los datos muestran que 438 de rata y A2 ligan superficies superpuestas pero distintas dentro de Notch1 NRR. Ambos epítopes incluyen el dominio HD central. 438
35 de rata y A2 interactúan con LNR-A; sin embargo, 438 de rata interactúa con una

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, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 y Leu 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

interacciones con la cadena pesada. Entre los residuos identificados, 351 de rata se liga a Notch1 NRR humano por lo menos en los residuos Asp1458, Val1463, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Ser1712 y Leu1713. Por otra parte, A2 no interactúa con los residuos Asp1458, Val1463, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Ser1712 y Leu1713.

5

del anticuerpo Notch1 NRR humano.

Residuos de Notch1 NRR humano			Residuo 351 de rata			Residuo 438 de rata			Residuo A2								
LNR-A	ASP	1458	ARG	58	H	TYR	58	H	TYR	49	L						
	ASN	1461	ARG	58	H							PHE	53	L			
			TRP	94	L												
	LYS	1462															
	VAL	1463	TRP	94	L												
	CYS	1464	ASN	92	L										ASN	92	L
			SER	93	L										SER	93	L
			TRP	94	L										TRP	94	L
	SER	1465													TRP	94	L
	LEU	1466	ILE	2	L										ASP	1	L
			GLN	27	L										ILE	2	L
			SER	93	L										GLN	27	L
															SER	93	L
															TRP	94	L
	GLN	1467						SER	56	L							
	ASN	1469						PHE	98	H							
LNR-B	LYS	1499							SER	30	H						
									SER	31	H						
									ASN	52	H						
	TYR	1500							PRO	53	H						
									ASN	54	H						
	PHE	1501							ARG	99	H						
	SER	1502							ARG	99	H						
	ASP	1503							ARG	50	H						
									ASN	52	H						
									ASN	54	H						
									SER	56	H						
								ARG	99	H							
	HIS	1505						ASN	54	H							
	ASP	1507						SER	56	H							
								ASN	54	H							
Bucle S1	LEU	1580	PHE	98	H	PRO	97	H									
	MET	1581	GLN	53	L												
	PRO	1582	PHE	98	H												
	TYR	1621	ARG	52A	H												
	GLY	1622	ARG	52A	H												
	ARG	1623	ARG	52A	H												
	ASP	1671	TYR	32	H												
			GLN	97	H												
	VAL	1672	GLN	97	H												
			PHE	98	H												
	ARG	1673	HIS	31	H												
			TYR	32	H												
			ARG	52A	H												
			GLU	95	H												
			GLY	96	H												
			GLN	97	H												
	GLY	1674	PHE	98	H												
			PHE	98	H												
Núcleo HD	LEU	1707				ASN	30	L									
	ALA	1708				ASN	30	L	PHE	98	H						

SER	1709							GLY	97	H
LEU	1710	LYS	28	L	ARG	28	L	PHE	98	H
								GLY	97	H
								PHE	98	H
GLY	1711	LYS	28	L	ARG	28	L	ARG	99	H
		SER	30	L	ASN	30	L	PHE	98	H
					GLY	68	L			
SER	1712	LYS	28	L	ARG	28	L			
		SER	30	L	ASN	30	L			
LEU	1713	SER	30	L	ASN	30	L			
ASN	1714	SER	30	L	ASN	30	L	PHE	91	L
		SER	67	L	SER	67	L	TYR	92	L
		GLY	68	L						
ILE	1715	THR	31	L				TYR	92	L
PRO	1716	GLN	53	L	GLN	53	L	ASP	28	L
								TYR	92	L
TYR	1717				GLN	53	L			
LYS	1718	ASN	32	L	ASP	32	L	ALA	99	H
		TYR	50	L	PHE	50	L	TYR	100	H
		GLN	53	L	GLN	53	L			

La Figura 6 muestra la superposición de las estructuras de Notch1 NRR humano ligadas a anticuerpos 438 humano y A2; Notch 1 NRR humano se encuentra en la parte inferior. Las cadenas pesadas de 438 de rata y A2 se muestran en negro, y las cadenas livianas, en gris, se encuentran entre las dos cadenas pesadas. Como se muestra en la Figura 6, la orientación de los anticuerpos 438 de rata y A2 con respecto a NRR se rota casi 180 grados, de manera que el terminal N de la cadena liviana de 438 de rata señale LNR-A, mientras que la cadena liviana de A2 señala LNR-C (en la región posterior de Notch1 NRR). Esto posiciona las cadenas pesadas en lados opuestos de las dos cadenas livianas desde el punto de vista de NRR. Por lo tanto, la cadena pesada de A2 se encuentra en el lado opuesto en la cadena liviana del bucle S1.

La **Figura 7** muestra la superposición de las estructuras de Notch1 NRR (mostradas como cintas) ligadas a anticuerpos 351 de rata y A2 (mostrados como superficies moleculares). Las cadenas pesadas de 351 de rata y A2 se muestran en negro. La cadena liviana de 351 de rata se muestra en gris oscuro, y la cadena liviana de A2 se muestra en gris claro. La **Figura 7** muestra que los anticuerpos 351 de rata y A2 se ligan en orientaciones opuestas, lo que confirma su asociación con epítopes únicos.

20

Ejemplo 5

Caracterización funcional de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en ensayos basados en células

A. Tratamiento con EDTA en el ensayo del gen informante Notch1

25 En ausencia de ligando, el receptor Notch1 escindido de S1 heterodimérico

permanece inactivo en la membrana celular. Los dominios Notch1 NRR adoptan una conformación autoinhibidora sepultando el sitio de escisión 2 (S2), con lo que se impide el acceso a las metaloproteasas. Los dominios Notch1 NRR se asocian mediante interacciones no covalentes que se estabilizan mediante cationes divalentes, tales como el calcio. Sin embargo, las interacciones inhibitoras de los dominios Notch1 NRR pueden ser interrumpidas por el agente quelante EDTA. La quelación cálcica por EDTA tiene por resultado un rápido desprendimiento del dominio extracelular de la membrana celular y es suficiente para activar la señalización de Notch1 (Rand et al., Mol. Cell. Biol. 20(5):1825-35, 2000).

Para determinar si los anticuerpos inhibidores anti-Notch estabilizan el Notch1 NRR en una conformación inactiva luego de la quelación de cationes divalentes, las células informantes Notch1 (véase la sección B más adelante) son preincubadas con anticuerpos 438-mIgG1 de rata, 351-mIgG1 de rata o A2, y con anticuerpo anti-E. tenella de control, y luego, se las trata con 5 mM de EDTA. Unas células informantes Notch1 humanas se colocan en placas de 96 cavidades de paredes blancas a razón de 40.000 células por cavidad, y se las cultiva durante la noche en medio McCoy's 5A, FBS al 10%, Pen/Strep/glutamina. Se retira el medio por aspiración y se lo reemplaza por un medio que contiene anticuerpos 438-mIgG1 de rata, 351-mIgG1 de rata o A2, y anticuerpo anti-E. tenella de control a razón de 0, 0,01, 0,1, 1, 10 y 30 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de los pretratamientos de anticuerpo durante 1 hora, se añade EDTA a las células con una concentración final de 5 mM y se incuba a 37 °C en 5% de CO₂ durante 6 horas. Se utiliza el sistema de ensayo Dual-Glo Lucifera (Promega) para medir las actividades de la 8xCSL luciérnaga-luciferasa (inducido por Notch1) y los informantes Renilla-luciferasa (constitutivos). Se dividen las lecturas de luminescencia de la luciérnaga-luciferasa por las lecturas de *Renilla*-luciferasa para calcular los niveles de la señalización de Notch1. Se calcula un promedio de 3 réplicas para cada tratamiento, y se grafica junto con las desviaciones estándares.

En la Tabla 15 se muestra el ensayo de gen informante de Notch1 con concentraciones crecientes de anticuerpos 438-mIgG1 de rata, 351-mIgG1 de rata y A2, y anticuerpo anti-E. tenella de control, en presencia del agente quelante EDTA y ausencia de ligando. Los datos muestran que la adición solo de EDTA a la línea de células informantes Notch1 estimula la activación del gen informante luciérnaga-luciferasa (véase la condición 0 µg/ml). Como se esperaba, el anticuerpo anti-E. tenella de control no puede inhibir la señalización de Notch1. En cambio, el

pretratamiento de las células con concentraciones crecientes de anticuerpos 438-mlgG1, 351-mlgG1 y A2 inhibe la activación del gen informante luciérnaga-luciferasa de una manera dependiente de la dosis en presencia de EDTA. Con concentraciones de 1 µg/ml, 10 µg/ml y 30 µg/ml, las relaciones entre luciferasa de luciérnaga y luciferasa de renilla de los tratamientos de 351-mlgG1 de rata, 438-mlgG1 de rata y A2 son significativamente menores que anti-E. tenella de control, lo que indica una inhibición de la señalización de Notch1.

Tabla 15. Ensayo de gen informante de Notch1 llevado a cabo con concentraciones crecientes de anticuerpos 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata y A2, y de anticuerpo anti-E. tenella de control en presencia del agente quelante EDTA y ausencia de ligando.

Concentración de anticuerpo	Luminescencia de luciérnaga/Renilla					
	0 µg/mL	0,01 µg/mL	0,1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
351-mlgG1 de rata	315,2	303,9	202,1	84,8	62,1	57,0
438-mlgG1 de rata	333,5	338,2	245,5	116,9	54,3	46,9
A2	307,1	312,3	172,5	89,9	63,5	55,2
ANTI-E. TENELLA	266,7	267,2	299,0	278,4	257,1	229,0
Desviaciones estándares						
351-mlgG1 de rata	37,3	23,7	33,6	6,6	2,0	4,8
438-mlgG1 de rata	20,5	13,2	9,9	14,5	9,0	9,0
A2	25,0	17,7	10,7	14,9	7,8	8,0
ANTI-E. TENELLA	16,5	34,1	48,4	27,0	23,1	6,2

B. Construcción de línea celular para el ensayo de cocultivo de gen informante de Notch1

Se ensayan las actividades inhibitoras de los anticuerpos 438 humanizados y 351 humanizados anti-Notch1 en un ensayo de cocultivo de gen informante Notch1, descrito en el Ejemplo 2. Los anticuerpos 438 humanizados y 351 humanizados se preincuban con células informantes Notch1 y, luego, se las cocultiva con células DLL4-HEK293 para activar la señalización de Notch1 o con células parentales HEK293 como control.

Para generar la línea de células informantes Notch1, se lleva a cabo una serie de tres transfecciones secuenciales estables en la línea de células de osteosarcoma humano U-2 OS (ATCC, Manassas, VA). En la primera transfección se utiliza un vector para la expresión de Notch1 humano de longitud completa o de Notch1 de ratón sobre

la base de la estructura principal pCMV6-Entry-Myc-Flag (Origene), y en ambos se confirman las secuencias de ADN correctas de los insertos Notch1. Después de la transfección con el reactivo de transfección *TransIT-LT1* (Mirus, Madison, WI), se seleccionan células U-2 OS en G418 y se aíslan líneas clonales. Se vuelven a transfectar segundos clones U-2 OS que expresan Notch-1 estable con el vector pGL4.27 [*luc2P*/minP/Hygro] (Promega, Madison, WI) que contienen ocho copias tándem de la secuencia mejoradora de CSL (CGTGGGAAAAT), se seleccionan en higromicina B más G418, y se aíslan líneas clonales. El constructo informante 8xCSL Luciérnaga-luciferasa es sensible a la señalización de Notch1 activada (por ejemplo, véase Jeffries et al., Mol. Cell. Biol. 22(11):3927-3941, 2002). En tercer lugar, se vuelven a transfectar las células Notch1-pGL4.27 U-2 OS con el vector pGL4.74 [*hRluc*/TK] (Promega) más el Linear Puromycin Marker (Clontech, Mountain View, CA), seleccionado en Puromicina, higromicina B y G418, y se aíslan las líneas clonales. El vector pGL4.74 codifica el gen *Renilla*-luciferasa que se expresa de manera constitutiva desde un promotor HSV-TK y funciona como control interno. La triple línea estable U-2 OS transfectada (denominada en la presente “células informantes Notch1”) se mantiene en medio McCoy’s 5A (Gibco, Grand Island, NY) que contiene FBS al 10%, 1X penicilina/estreptomicina/L-glutamina (Gibco), 0,25 mg/ml de G418 sulfato, 0,3 mg/ml de higromicina B y 0,001 mg/ml de puromicina.

Para generar las células que expresan ligando, se transfectan células HEK293 (ATCC) con vectores para la expresión de DLL4 humano o de DLL4 de ratón. Ambos vectores se basan en la estructura principal pCMV6-AC-HA-His (Origene, Rockville, MD), y se confirman las secuencias de ADN correctas de los insertos DLL4. Después de la transfección, se seleccionan células HEK293 en 0,5 mg/ml de G418, y se aíslan células clonales, se las expande y analiza para establecer la expresión del DLL4. Los clones con una elevada expresión de DLL4 y una elevada inducción de actividad de informante Notch1 en las células U-2 OS se utilizan para evaluar el efecto inhibitor de los anticuerpos anti-Notch1.

Las lecturas luminescentes de luciérnaga-luciferasa se dividen por la lectura de control interno de *Renilla*-luciferasa para normalizar las señales (en la presente denominada “relación F/R”). Para calcular la inducción “veces” de la señalización de Notch1, las relaciones F/R ratios generadas en los ensayos de informante de cocultivo DLL4-HEK293 se dividen por las relaciones F/R de los cocultivos parentales HEK293 y se denominan unidad relativa de luciferasa (RLU) o de actividad.

Una titulación de 438 VH1.1/VL1.8 humanizado y A2 en los ensayos de

cocultivo de informante de Notch1 humano y murino muestran la posible inhibición de la señalización de Notch1 de manera dependiente de la dosis. Las Figuras 8 y 9 muestran la actividad neutralizante de anticuerpos 438 VH1.1/VL1.8 humanizado y 438 de rata contra la señalización dependiente de Notch1 en células informantes de Notch1 de humano y ratón, respectivamente. 438 VH1.1/VL1.8 humanizado muestra actividad neutralizante equivalente con el de 438 de rata, en ensayos de informantes de señalización dependiente de Notch1 de humano y ratón. Por lo tanto, 438 VH1.1/VL1.8 humanizado retiene totalmente la actividad neutralizante de 438 de rata.

Los valores de IC₅₀ (nM) de variantes 438-mIgG1 de rata y 438 humanizadas se calculan a partir de la inhibición de la señalización dependiente de Notch1 de los ensayos de cocultivo de gen informante Notch1, como se indica en la siguiente Tabla 16. El 438 VH1.1/VL1.8 humanizado muestra el nivel más significativo de inhibición contra la señalización de Notch1 de humano y ratón, representado en los valores de IC₅₀ más bajos entre todas las variantes 438 humanizadas.

Tabla 16. Valores de IC₅₀ (nM) de variantes de 438-mIgG1 de rata y 438 humanizada. (nd = no se determinó)

Anticuerpo	A2	r438-mIgG	VH1.0/VL1.1	VH1.1/VL1.0	VH1.1/VL1.1	VH1.1/VL1.3	VH1.1/VL1.9	VH1.0/VL1.8	VH1.1/VL1.8	VH1.1/VL1.5	r438-hIgG
Notch1 humano	0,31	0,68	1,19	0,46	0,657	0,45	0,38	1,87	0,17	0,35	0,65
Notch1 de ratón	0,32	0,71	nd	nd	nd	0,62	nd	1,37	0,46	0,50	nd

Los efectos inhibidores de los anticuerpos de 351 de rata y A2 anti-Notch1 sobre el ensayo informante de cocultivo se analizan mediante la adición de concentraciones crecientes de anticuerpo durante un intervalo de aproximadamente 0,01 nM a 200 nM. Para calcular la inhibición porcentual (%) de los cocultivos tratados con anticuerpo anti-Notch1, se divide la RLU de concentraciones crecientes de tratamientos con anticuerpo por un control no tratado mediante la fórmula (1-(tratado/sin tratar)*100).

Una titulación de anticuerpos de 351 de rata y A2 en ensayos de cocultivo de informante Notch1 humano y murino muestra la actividad neutralizante única de 351 de rata contra la señalización de Notch1. Como se muestra en las Figuras 10 y 11 y en la Tabla 17, tanto 351 de rata como A2 inhiben la señalización de manera dependiente de la dosis, y tienen valores de IC₅₀ similares calculados de los ensayos de cocultivo de informante Notch1. La Figura 10 y la Tabla 17 muestran que A2 logra una inhibición máxima (inhibición constante) de la señalización de Notch1 a

aproximadamente 100% en ensayos de cocultivo de informante Notch1 humano cuando las concentraciones de anticuerpo son superiores a 20 veces el valor de IC50. En cambio, 351 de rata logra una máxima inhibición de solamente el 85%, que es inferior a la inhibición máxima observada para A2. 351 de rata no logra la inhibición máxima del 100 % aún cuando las concentraciones de anticuerpo son de 250 el valor de IC50. La **Figura 11** y la **Tabla 17** muestran que se observan resultados similares para los ensayos de cocultivo de informante Notch1 de ratón. A2 logra una inhibición máxima de la señalización de Notch 1 de aproximadamente 86% en los ensayos de cocultivo de informante de Notch1 de ratón. En cambio, 351 de rata logra una inhibición máxima de solamente el 55%, que es inferior a la inhibición máxima del 86% observada para A2.

Tabla 17. Actividad neutralizante de anticuerpos 351 de rata y A2 contra señalización dependiente de Notch1 humano y murino, en un ensayo de gen informante.

Anticuerpo	Actividad neutralizante (RGA humano)		Actividad neutralizante (RGA murino)	
	IC50 (nM)	% de inhibición	IC50 (nM)	% de inhibición
351 de rata	0,4	~85%	0,3	55%
A2	0,3	~100%	0,2	86%

Las **Figuras 12 y 13** muestran la actividad neutralizante de variantes 351 humanizadas y 351-mlgG1 de rata en ensayos informantes de señalización dependiente de Notch de humano y ratón, respectivamente. En la **Tabla 18** se proveen los valores de IC50 (nM) de variantes 351 humanizadas, 351-mlgG1 de rata y A2 calculados de la inhibición de la señalización dependiente de Notch 1 de los ensayos de cocultivo de gen informante Notch1. Los datos muestran que el 351 VH1.0/VL1.1 humanizado presenta un perfil de actividad neutralizante que es similar al de 351-mlgG1 de rata y 351 de rata. El 351 VH1.0/VL1.1 humanizado logra una inhibición máxima de señalización de Notch1 a aproximadamente ~87,4%, que es inferior a la inhibición máxima observada para A2.

Tabla 18. Actividad neutralizante de variantes de 351-mlgG1 de rata y 351 humanizadas contra la señalización dependiente de Notch1 humano y murino en un ensayo de gen informante.

Anticuerpo	Actividad neutralizante (RGA humano)		Actividad neutralizante (RGA murino)	
	IC50 (nM)	% de Inhibición	IC50 (nM)	% de Inhibición
351-mlgG1 de rata	0,22	~85,4%	0,42	~ 51%
351 VH1.0/VL1.1 humanizado	0,19	~ 87,4%	0,38	~ 48%
351 VH1.0/VL1.4	0,17	~ 85,4%	0,49	~ 46%

humanizado				
A2	0,27	~99,1%	0,36	~82%

Ejemplo 6

Base estructural y funcional para la actividad neutralizante del clon 351

Para mantener la integridad de la estructura del Notch1 NRR se requiere un Ca^{2+} ligado en cada uno de los dominios de LNR-A, B y C del Notch NRR. La remoción de Ca^{2+} , por ejemplo, mediante la adición de EDTA al medio de células que expresan Notch1, genera la desestabilización de la estructura de Notch1 NRR. Esto resulta en la exposición del sitio de escisión de la S2 metaloproteinasa en el Notch1 NRR y la activación de la señalización de Notch1 (Rand et al., Mol. Cell. Biol. 20(5):1825-35, 2000).

La estructura cocrystalina de 351 de rata Fab con Notch1 NRR humano tiene cuatro complejos independientes en un solo cristal. Sin embargo, solo uno de los cuatro complejos contiene el previsto Ca^{2+} ligado a LNR-A. La **Figura 14A** muestra la interacción de 351 de rata y Notch1 NRR humano en la región LNR-A del complejo 1. En esta estructura, un residuo de carga negativa en Notch1 NRR, Asp1458, tiene una interacción iónica con el calcio presente en la estructura. La **Figura 14B** muestra la interacción de 351 de rata y Notch1 NRR humano en la región LNR-A del Complejo 2. El Complejo 2 es una imagen representativa de los Complejos 2-4. En los Complejos 2-4, en lugar de tener una interacción iónica con calcio, Asp1458 del Notch1 NRR humano forma un puente de sal con un residuo de carga positiva en 351 de rata VH CDR2, Arg58. Esto indica que el Arg 58 de carga positiva de 351 de rata compite con el Ca^{2+} de carga positiva para la ligación al Asp1458 de carga negativa del Notch1 NRR humano.

Para demostrar el significado del residuo Arg58 de carga positiva en las propiedades funcionales de 351 de rata, se generan anticuerpos mutantes 351-mIgG1 de rata mutante en los que Arg58 en el VH está mutado en forma de un residuo neutro, Tyr (así como Arg58-Tyr en combinación con Val60-Ala o Arg). Los anticuerpos 351-mIgG1 de rata mutante se someten a ensayos de informante de inhibición de la señalización de Notch1, y los resultados se muestran en la **Figura 15** y en la **Tabla 19**. Como se muestra, 351 de rata logra una inhibición máxima de solamente el 87%, mientras que 351-mIgG1 de rata mutante y A2 logran una mayor inhibición máxima de ~95% y ~98%, respectivamente.

Tabla 19. Valores de IC50 (nM) e inhibición máxima (%) para 351 de rata, 351 de rata

mutante y A2.

Anticuerpo	A2	Peso de 351 de rata	351 VH R58Y de rata	351 VH R58Y/V60A de rata	351 VH R58Y/V60R de rata
IC50 (nM)	0,18	0,19	0,21	0,6	0,11
Inhibición máxima (%)	97,7%	87,5%	95,3%	95,3%	95,3%

Ejemplo 7

Efectos de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en la formación de brotes de células endoteliales, angiogénesis y vascularización

5

A. Evaluación *in vitro* de los anticuerpos inhibidores anti-Notch1

Se examina el efecto de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en la angiogénesis en un modelo *in vitro* de formación de brotes de células endoteliales mediante en ensayo de perlas en gel de fibrina (FGBA) de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (también denominadO en la presente HUVEC-FGBA). Se lleva a cabo una versión modificada del HUVEC-FGBA esencialmente como se describe en Nakatsu, et al. (*Microvasc. Res.* 66 (2):102-112, 2003), excepto que los fibroblastos asociados al tumor pulmonar humano primario (LTAF) se sustituyen con fibroblastos de piel Detroit 551. Los brotes de HUVEC son examinados 10-15 días después de la adición de los fibroblastos.

15

Se desagregan mecánica y enzimáticamente tejido de tumor pulmonar humano (muestra 87852A1; Asterand, Detroit, MI). Se criban las células a través de una criba de células de 40 µm para obtener una única suspensión celular. Se aíslan las células viables después del tratamiento con tampón de lisis para glóbulos rojos (Roche, Indianápolis, IN) y separación magnética de las células muertas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se establecen los fibroblastos asociados a tumor pulmonar primario, y se los mantiene en medio RPMI que contiene FBS al 20%.

20

Los HUVEC-FGBA que contienen LTAF se tratan con anticuerpos 438 de rata, 351 de rata o A2. También se incluye medio solo (sin tratar) y tratamientos de control con AVASTIN inhibidor anti-VEGF (Genentech, So. San Francisco, CA). La **Figura 16** muestra imágenes epifluorescentes representativas de inmunoteñido de CD31-Cy3 el día 10 de brotes de HUVEC tratados con 438 de rata, 351 de rata y A2. Se muestra un incremento en los brotes de HUVEC y en las longitudes de vasos sanguíneos del tratamiento de 438 de rata y 351 de rata en comparación con el medio de control solo (sin tratar). En cambio, el tratamiento con AVASTIN inhibidor anti-VEGF impide directamente la formación de brotes de HUVEC. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de Notch1 con 438 de rata y 351 de rata y A2 desregulariza la

25

30

angiogénesis de manera distinta a los inhibidores anti-VEGF, tal como AVASTIN.

Por otra parte, la **Tabla 20** muestra que 438 de rata y 351 de rata incrementa la cantidad promedio de puntos de ramificación de brote por perla en comparación con el anticuerpo anti-E. tenella en un HUVEC-FGBA el día 6 y el día 12 del tratamiento. Sin embargo, el efecto de 351 de rata en la cantidad promedio de puntos de ramificación fue menor el día 6 en comparación con 438 de rata y A2. El día 12, tanto 438 de rata como 351 de rata, y también A2, inducen una cantidad similar de puntos de ramificación por perla. Durante la angiogénesis, la señalización activa de Notch1 regula de manera negativa la cantidad de células de puntas endoteliales y, por lo tanto, modula los niveles de ramificación y de formación de brotes (Hellstrom, M. et al., *Nature* 445 (7129):776-780, 2007).

Tabla 20. Cantidad promedio de puntos de ramificación/perla en el tratamiento con 351 de rata, 438 de rata y A2 en HUVEC-FGBA.

Día 6				
	351 de rata	438 de rata	A2	ANTI-E. TENELLA
Cantidad promedio de puntos de ramificación/perla	2,7	6,1	5,9	1,3
Desviación estándar	1,3	1,8	2,1	1,1
Día 12				
	351 de rata	438 de rata	A2	ANTI-E. TENELLA
Cantidad promedio de puntos de ramificación/perla	9,3	11,2	10,6	1,2
Desviación estándar	1,8	2,6	2,3	1,1

B. Evaluación in vivo de los anticuerpos inhibidores anti-Notch1

También se examinó el efecto de los anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en un ensayo de ratón *in vivo* de angiogénesis y vascularización. La retina neonatal es un modelo bien caracterizado de angiogénesis y ha sido utilizada para estudiar el rol de la vía de Notch en este proceso. Existe una amplia angiogénesis en la retina de ratón, que empieza en el nacimiento. Como sucede en la retina humana, la vasculatura se origina en el nervio óptico y se extiende para formar una red de vasos sanguíneos que luego se extienden hacia abajo a fin de establecer una red secundaria. La manipulación genética y farmacológica de la señalización de Notch ha demostrado que se requiere una adecuada señalización de Notch para la angiogénesis en la retina neonatal (Hellstrom, M. et al., *Nature* 445(7129):776-780, 2007).

Las ratonas CD-1 preñadas se alojan por separado y se supervisan regularmente para observar el nacimiento de la camada. Para 438-mlgG1 de rata, las crías reciben 1 y 3 días después del nacimiento dosis de 10 mg/kg de anticuerpo anti-E. tenella de control, 10 mg/kg de 438-mlgG1 de rata o 10 mg/kg de A2. Para 351-

mlgG1 de rata, las crías reciben 1 y 3 días después del nacimiento dosis de 30 mg/kg de anticuerpo anti-E. tenella de control, 30 mg/kg de 438-mlgG1 de rata o 30 mg/kg de A2.

El día 5 después del nacimiento, las crías se someten a eutanasia, y se recolectan los ojos y se los fija durante la noche en formaldehído al 2%. Al día siguiente, se transfieren los ojos a PBS y se aíslan las retinas. Para teñir las retinas, se conjuga Isolectina B4 (Sigma, St. Louis, MO) con Alexa Fluor 488 mediante un kit de etiquetado (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se usa a razón de 15 mg/ml en PBS con suero de cabra al 10%, 1% de Triton X-100, 0,1% de azida de sodio y 0,1 mM de cada uno de CaCl_2 , MgCl_2 y MnCl_2 . Se lavan las retinas cinco veces en PBS con 1% de Triton X-100, 0,1% de azida de sodio y 0,1 mM de cada uno de CaCl_2 , MgCl_2 y MnCl_2 , y una vez final en PBS con 0,1% de azida de sodio y 0,1 mM de cada uno de CaCl_2 , MgCl_2 y MnCl_2 . Se recortan las retinas y se las monta con Fluormount-G (EMS, Hatfield, PA), y se forman imágenes en un microscopio confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss MicroImaging, LLC, Thornwood, NY). La **Figura 17** muestra imágenes confocales representativas del teñido con Isolectin B4-Alexa488 en un modelo de retina de ratón de angiogénesis después del tratamiento con 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata y A2. También se incluye control de anticuerpo anti-E. tenella y sin tratamiento.

Como se muestra en la **Figura 17**, la retina de una cría de ratón en el grupo de tratamiento con 438-mlgG1 de rata tiene una vasculatura diferente a las retinas de crías de ratón en los grupos de control de anticuerpo anti-E. tenella y sin tratamiento. Esto indica que el anticuerpo 438-mlgG1 de rata interrumpe la angiogénesis *in vivo*. En particular, las retinas del grupo de tratamiento de 438-mlgG1 de rata muestran una vasculatura más extensa, similar a la que se informó previamente después de la manipulación genética y farmacológica de la señalización de Notch1 (Hellstrom, M. et al., *Nature* 445 (7129):776-780, 2007). Esto indica que la inhibición de la señalización de Notch1 con 438-mlgG1 de rata tiene un impacto directo en la angiogénesis en la retina neonatal de ratón.

Como también se muestra en la **Figura 17**, la retina de una cría de ratón en el grupo de tratamiento con 351-mlgG1 de rata tiene una vasculatura similar a las retinas de crías de ratón en los grupos de control de anticuerpo anti-E. tenella y sin tratamiento. Por el contrario, la retina del grupo A2 muestra una vasculatura más extensa, similar a la que se informó previamente después de la manipulación genética y farmacológica de la señalización de Notch (Hellstrom, M. et al., *Nature* 445 (7129):776-780, 2007). Esto demuestra que, a diferencia de A2, el anticuerpo 351-

mlgG1 de rata no interrumpe de manera significativa la angiogénesis murina *in vivo* o que el efecto potencial de 351-mlgG1 de rata en la vasculatura murina no se observa en el momento elegido o con el régimen de dosificación evaluado.

5

Ejemplo 8

Efectos de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en líneas celulares que tienen receptores Notch1 nativos y mutantes

A. Efectos de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en la activación de Notch1 en la línea celular de fibroblasto humano CCD1076SK que tiene receptores Notch1 nativos.

10 La señalización de Notch1 se activa por ligación del ligando que induce cambios conformacionales dentro de los dominios extracelulares de Notch1 NRR, por lo que se exponen sitios de escisión de metaloproteasa y gamma-secretasa. La proteólisis resulta en la liberación del dominio intracelular Notch1 (Notch1^{ICD}), un activador transcripcional, desde la membrana celular. La activación de Notch1 y la
15 liberación de Notch1^{ICD} se examinan mediante análisis de transferencia Western de los extractos proteicos generados de la línea celular de fibroblasto humano CCD1076SK que se coloca en placas en el ligando DLL4 humano recombinante con concentraciones crecientes de anticuerpos 438 de rata, 351 de rata o A2, y anticuerpo anti-E. tenella de control durante 24 horas. Las moléculas de Notch1^{ICD} liberadas que
20 empiezan en un residuo de valina se detectan con el anticuerpo D3B8 (anti-Notch1^{ICD}) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

Para activar la señalización de Notch1, se cultivan fibroblastos de piel D1076SK en presencia de ligando DLL4. Se recubren placas de seis cavidades con 2 µg/ml de DLL4 humano recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) en 1X DPBS
25 que contiene CaCl₂ y MgCl₂. Los fibroblastos de piel 2x10E6 CCD1076SK en medio DMEM que contiene FBS al 10% se añaden a las cavidades recubiertas por DLL4 humano recombinante en presencia de 0, 0,001, 0,01, 0.1, 1 y 10 µg/ml de anticuerpos 438 de rata, 351 de rata y A2, y anticuerpo anti-E. tenella de control. Se incuban las células con los anticuerpos durante 24 horas a 37°C in 5% de CO₂. Se lisan las células
30 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 el cóctel inhibidor Complete Mini Protease (Roche) y 0,4 mM de PMSF. Los extractos se resuelven mediante SDS-PAGE en 7,5% de gel de poliacrilamida y se transfieren a papel de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia de iBlot Gel (Invitrogen). Las moléculas Notch1^{ICD} liberadas que
35 empiezan en un residuo de valina se detectan con anti-Notch1^{ICD} y, como control de

carga, anti-beta-actina usando procedimientos estándares de transferencia Western. Se lleva a cabo el análisis densitométrico en películas que se escanean con un BioRad GS-800 Calibrated Densitometer y se analizan con software Quantity One, versión 4.6.9 (BioRad). Se normalizan los niveles de Notch1^{ICD} al control de beta-actina en cada muestra y luego se comparan con el control no tratado.

Como se muestra en la **Figura 18**, la titulación de 438 de rata inhibe potencialmente la activación de Notch1 de manera dependiente de la dosis, como lo indican los niveles de Notch1^{ICD} liberado detectado. Como también se muestra en la **Figura 18** y en la **Tabla 21**, la titulación de 351 hasta 10 µg/mL muestra una menor inhibición de la activación de Notch1 de un receptor de Notch1 nativo en comparación con A2, como lo indican los niveles de Notch1^{ICD} liberado detectado. En todas las concentraciones, y en particular empezando en 0,1 µg/mL, 351 de rata muestra mayores niveles de Notch1^{ICD} liberado en comparación con A2.

Tabla 21. Análisis densitométrico de niveles de Notch1^{ICD} de la transferencia Western de la **Figura 18**.

Ab, µg/ml	Niveles de Notch1 ^{ICD} normalizado	
	351 de rata	A2
0	1,000	1,000
0,001	0,826	0,748
0,01	0,848	0,402
0,1	0,554	0,003
1	0,393	0,003
10	0,302	0,006

B. Efectos de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en la activación de Notch1 en la línea celular de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL) que tiene receptores de Notch mutantes.

Se informa la activación de Notch1 constitutiva y la liberación del dominio intracelular de Notch1 (Notch1^{ICD}) en un subconjunto de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL) y líneas celulares de T-ALL que alojan mutaciones dentro del dominio NRR del receptor de Notch1 (Weng et al., Science 306:269-271, 2004). Estas mutaciones se categorizan en tres clases principales. Las mutaciones de clase 1 son simples sustituciones de aminoácidos y pequeñas supresiones o inserciones en marco en HD1. Las mutaciones de clase 2 son inserciones más largas en la región distal de HD2 que relocalizan el sitio de escisión de S2-metaloproteasa más allá del dominio NRR autoinhibidor. Las mutaciones de clase 3, también denominadas mutaciones de expansión de yuxtamembrana (JME), desplazan el NRR alejándolo de la membrana celular.

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/VH1.8 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

Quantity One, versión 4.6.9 (BioRad). Se normalizan los niveles de Notch1^{ICD} al de beta-actina en cada muestra y luego se comparan con el control no tratado.

Como se muestra en la **Figura 19**, el tratamiento de células de HBP-ALL con concentraciones crecientes de 438-mIgG1 de rata y 438 VH1.1/VL1.8 humanizado
5 inhibe considerablemente la activación de Notch1 constitutiva, como lo indican los niveles de Notch1^{ICD} liberado detectado. Por ello, la mutación de leucina en prolina en la posición 1575 no afecta la capacidad de los anticuerpos 438-mIgG1 de rata y 438 VH1.1/VL1.8 humanizado de inhibir la activación de Notch1. Esto concuerda con la **Tabla 14** que muestra que el anticuerpo 438 de rata no interactúa con el aminoácido
10 en la posición 1575 en la estructura cocrystalina del anticuerpo NRR de tipo silvestre.

Como se muestra en la **Figura 20** y en la **Tabla 22**, el tratamiento de las líneas celulares de T-ALL: HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4 y DND-41 con concentraciones crecientes de 438-mIgG1 de rata, 351-mIgG1 de rata y A2 inhibe la activación de Notch1 de manera que depende de la dosis, como lo indica la menor
15 detección de Notch1^{ICD} liberado mediante análisis de transferencia Western y análisis densitométrico. En cambio, el tratamiento de las células Jurkat con concentraciones crecientes de 351-mIgG1 de rata y A2 no logra inhibir la activación de Notch1, como lo indica la detección del Notch1^{ICD} liberado mediante análisis de transferencia Western. Como se preveía, el anticuerpo anti-E. tenella de control no demuestra efectos en los
20 niveles de Notch1^{ICD} liberado en ninguna de las líneas celulares de T-ALL.

De manera similar, los anticuerpos 438-mIgG1 de rata, 351-mIgG1 de rata y A2 inhiben la activación de Notch1 y la liberación del Notch1^{ICD} en determinadas líneas celulares de T-ALL con mutaciones NRR de clase 1 (células HPB-ALL con L1575P, células ALL-SIL con L1594P, células MOLT-4 con L1601P y células DND-41 con
25 mutaciones de clase 1 de compuesto L1594P/ D1610V) y clase 2 (línea celular CCRF-CEM con una inserción de 12 aminoácidos en la posición 1595), y ni 351-mIgG1 de rata ni A2 logran inhibir la escisión del receptor de Notch1 y la liberación de Notch1^{ICD} en células Jurkat con una mutación JEM de clase 3. Por otra parte, 351-mIgG1 de rata muestra una mayor inhibición de la actividad de Notch1 de un receptor de Notch1
30 mutante, como se muestra en **Figura 20** y en la **Tabla 22**, en comparación con la inhibición de la activación de Notch1 de un receptor de Notch1 nativo mediante 351 de rata, como se muestra en la **Figura 18** y en la **Tabla 21**.

Tabla 22. Análisis densitométrico de niveles de Notch1^{ICD} de la transferencia Western de la **Figura 20** (n.d = no se determinó)
35

Ab, μg/ml	Niveles de Notch ¹ ^{ICD} normalizados											
	HPB-ALL		ALL-SIL		CCRF-CEM		MOLT-4		DND-41		Jurkat	
	A2	351- mlgG1 de rata	A2	351- mlgG1 de rata	A2	351- mlgG1 de rata	A2	351- mlgG1 de rata	A2	351- mlgG1 de rata	A2	351- mlgG1 de rata
0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
0,001	0,852	0,833	1,565	0,982	1,119	0,982	n.d.	n.d.	0,787	1,020	1,197	1,535
0,01	1,145	0,886	1,310	0,712	1,276	1,038	0,962	1,525	0,840	0,988	1,165	1,435
0,1	0,330	0,156	0,068	0,080	0,424	0,413	0,644	0,751	0,479	0,367	0,983	1,406
1	0,038	0,075	0,033	0,030	0,048	0,043	0,075	0,284	0,199	0,322	1,152	1,078
10	0,041	0,020	0,043	0,019	0,027	0,034	0,043	0,082	0,114	0,219	1,586	1,204

C. Efectos de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en la viabilidad de la línea celular de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL) que tiene receptores de Notch1 mutantes.

5 También se evalúan los efectos de los anticuerpos anti-Notch1 en las células HBP-ALL mediante un indicador de viabilidad celular MTS (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de células viables después del tratamiento. El reactivo MTS se convierte en un producto que puede medirse con una densidad óptica de 490 nanómetros (O.D. 490 nm) mediante células metabólicamente activas, pero no

10 muertas. Las células HBP-ALL (1x10⁴ células/cavidad) en medio RPMI 1640 que contiene 10% de FBS, Pen/Strep/Glutamina, se incuban con 0, 0,47, 1,88, 7,5 y 30 μg/ml de anticuerpos 438 VH1.1/VL1.8 humanizados, 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata y A2, y anticuerpo anti-E. tenella de control durante 7 días, y luego se ensayan con el reactivo MTS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 La **Tabla 23** muestra el ensayo de viabilidad de MTS de los tratamientos con anticuerpos inhibidores anti-Notch1 de células HPB-ALL con concentraciones crecientes de anticuerpos 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata y A2, y de anticuerpo anti-E. tenella de control. Como resultado de ello, las células HBP-ALL tratadas con concentraciones crecientes de 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata y A2 hasta 30

20 μg/ml presentan menores niveles del reactivo MTS convertido a O.D. 490 nm que los tratamientos con anti-E. tenella de control. Esto indica que hay menos células presentes en las células tratadas con 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata y A2, lo cual es el resultado de una mayor muerte celular y/o una menor proliferación.

25 **Tabla 23.** Ensayo de viabilidad de MTS de células de leucemia HPB-ALL tratadas con anticuerpos 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata y A2, y anti-E. tenella de control.

O.D. 490nm					
Concentración de anticuerpo	0 μg/mL	0,47 μg/mL	1,88 μg/mL	7,5 μg/mL	30 μg/mL
438-mlgG1 de rata	0,361	0,394	0,284	0,180	0,110
351-mlgG1 de rata	0,366	0,267	0,175	0,119	0,082
A2	0,355	0,271	0,167	0,107	0,076
ANTI-E. TENELLA	0,366	0,425	0,440	0,427	0,445

Desviaciones estándares					
438-mIgG1 de rata	0,003	0,004	0,007	0,019	0,010
351-mIgG1 de rata	0,009	0,015	0,015	0,011	0,006
A2	0,002	0,018	0,004	0,008	0,013
ANTI-E. TENELLA	0,012	0,004	0,056	0,024	0,010

Se observan resultados similares para 438 VH1.1/VL1.8 humanizado como se indica en la **Tabla 24**, que ilustra un ensayo de MTS de los tratamientos con anticuerpos inhibidores anti-Notch1 de células HPB-ALL con concentraciones crecientes de 438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 438-mIgG1 de rata y anti-E. tenella de control. Por ello, además de inhibir la activación de Notch1, los anticuerpos 438 VH1.1/VL1.8 humanizados también inhiben el crecimiento de células cancerosas con una mutación en el dominio NRR de Notch1, una característica común en todos los pacientes con T-ALL.

Tabla 24. Ensayo de viabilidad de MTS de células de leucemia HPB-ALL tratadas con anticuerpos 438VH1.1/VH1.8 humanizados, 438-mIgG1 de rata y anti-E. tenella de control.

O.D. 490nm					
Concentración de anticuerpo	0 µg/mL	0,47 µg/mL	1,88 µg/mL	7,5 µg/mL	30 µg/mL
438 VH1.1/VL1.8 humanizado	0,464	0,427	0,306	0,204	0,162
438-mIgG1 de rata	0,456	0,478	0,373	0,259	0,190
ANTI-E. TENELLA	0,457	0,488	0,428	0,524	0,525
Desviaciones estándares					
438 VH1.1/VL1.8 humanizado	0,016	0,014	0,011	0,009	0,003
438-mIgG1 de rata	0,012	0,038	0,051	0,034	0,004
ANTI-E. TENELLA	0,008	0,003	0,099	0,029	0,013

Para demostrar la actividad *in vitro* de anticuerpos 351 de rata mutantes, las células HPB-ALL se trataron con una concentración creciente de anticuerpos 351-mIgG1 de rata, 351(R58Y)-mIgG1 de rata, 351(R58Y/V60A)-mIgG1 de rata, 438 VH1.1/VL1.8 humanizado, A2 o anti-E. tenella de control. La **Tabla 25** muestra un ensayo de MTS de los tratamientos con anticuerpos inhibidores anti-Notch1 y sus valores de IC₅₀ resultantes. Los anticuerpos 351(R58Y)-mIgG1 de rata y 351(R58Y/V60A)-mIgG1 de rata inhiben el crecimiento de HPB-ALL, pero de manera más similar al 438 VH1.1/VL1.8 humanizado que el anticuerpo 351-mIgG1 de rata de tipo silvestre por sus valores de IC₅₀. Por ello, el residuo Arg58 en 351-mIgG1 de rata contribuye a su potente actividad inhibidora contra un receptor de Notch1 con una NRR mutante.

Tabla 25. Ensayo de viabilidad de MTS de células de leucemia HPB-ALL tratadas con

anticuerpos 351-mIgG1 de rata mutante y valores de IC₅₀ (nM).

O.D. 490nm							IC50, nM
Concentración de anticuerpo	0 µg/mL	0,0391 µg/mL	0,1563 µg/mL	0,625 µg/mL	2,5 µg/mL	10 µg/mL	
351-mIgG1 de rata	0,755	0,726	0,514	0,311	0,235	0,192	1,27
351-R58Y-mIgG1 de rata	0,697	0,715	0,582	0,345	0,236	0,184	2,17
351 R58Y/V60A-mIgG1 de rata	0,697	0,775	0,667	0,363	0,265	0,184	2,49
438 VH1.1/VL1.8 humanizado	0,694	0,702	0,601	0,339	0,223	0,198	2,26
A2	0,755	0,706	0,568	0,325	0,204	0,178	1,85
ANTI-E. TENELLA	0,694	0,735	0,758	0,759	0,772	0,774	n.a.
Desviaciones estándares							
351-mIgG1 de rata	0,017	0,032	0,018	0,014	0,015	0,005	
351-R58Y de rata	0,020	0,008	0,024	0,012	0,019	0,006	
351-R58Y/V60A de rata	0,020	0,024	0,025	0,017	0,014	0,007	
438 VH1.1/VL1.8 humanizado	0,022	0,006	0,023	0,016	0,014	0,008	
A2	0,017	0,012	0,029	0,010	0,009	0,017	
ANTI-E. TENELLA	0,022	0,023	0,024	0,009	0,034	0,054	

Ejemplo 9

Efectos de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en el crecimiento *in vivo* de xenoinjertos de tumor humano

A. Coinmunohistoquímica de Notch1 y Jagged1

Los efectos de los anticuerpos inhibidores anti-Notch1 se evalúan en modelos preclínicos con la expresión de Notch1 en xenoinjertos de tumores y en células estromales huésped, a fin de maximizar su posible eficacia. Para identificar un modelo preclínico que expresa Notch1 y uno de sus ligandos, Jagged1, se lleva a cabo inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-Notch1 y anti-Jagged1 en el xenoinjerto derivado del paciente (PDX) con cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) 37622A1, en adelante denominado “37622A1 NSCLC PDX.” Un fragmento tisular de 37622A1 NSCLC PDX se fija con formalina y se incrusta en parafina (FFPE) mediante procedimientos histológicos estándares. Se cortan secciones de FFPE de cinco micrómetros, se les retira la cera y se hidratan en agua destilada. Los antígenos se recuperan en tampón de citrato a pH 6,0 en una olla a presión. Se bloquea peroxidada endógena con 0,3% de H₂O₂ durante 15 minutos. Las secciones se incuban con bloqueador de proteína DAKO durante 20 minutos. La biotina endógena se bloquea mediante un kit de bloqueo de avidina/biotina (Vector). Se aplica una dilución 1:50 de anti-Notch1 de conejo (ab52627; Abcam) a las secciones durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aplica IgG-biotina antirratón (JacksonImmuno) a las secciones durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agrega estreptavidina-HRP a las secciones durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se usa DAB para desarrollar color durante 5 minutos. Las secciones se calientan a 98 °C durante 10 minutos en tampón

de citrato a pH 6,0 para destruir los anticuerpos primarios anti-Notch1 ligados y los anticuerpos secundarios IgG antirratón de la primera reacción. Las secciones se bloquean en bloqueador de proteína DAKO durante 20 minutos y se incuban con una dilución 1:100 de anticuerpo anti-Jagged 1 de ratón (Santa Cruz) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se aplica un polímero IgG-HRP antirratón (DAKO) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se usa sustrato ImmPACT VIP para desarrollar color durante 7 minutos. Las secciones se contratiñen brevemente en hematoxilina de Mayer, se deshidratan, se aclaran y se cubren con un cubreobjetos.

Como se muestra en la **Figura 21**, 37622A1 NSCLC PDX tiene expresión heterogénea del receptor de Notch1 humano (a la izquierda de la línea punteada) y ligando Jagged1 humano (a la derecha de la línea punteada) dentro de la agrupación de células tumorales (marcadas con una línea continua). También se detecta Notch1^{ICD} nuclear (flechas) in la interfase de las células tumorales de Notch1 humano y Jagged1 humano, lo cual indica señalización de Notch1 activa. Dentro del estroma de ratón, también se detecta Notch1 murino en la vasculatura asociada a PDX, lo cual coincide con el descubrimiento previo de que la señalización de Notch1 regula la angiogénesis en la retina neonatal murina. El patrón de expresión de Notch1 y Jagged1 en 37622A1 NSCLC PDX indica que es un modelo importante para examinar los efectos *in vivo* de los anticuerpos anti-Notch1.

En NSCLC, K-ras es un oncogén frecuentemente mutado que promueve el crecimiento tumoral. Por ello, se secuencian el gen K-ras de 37622A1 NSCLC PDX para determinar si contiene K-ras silvestre o mutado. El ADN genómico se aísla de un fragmento de 37622A1 NSCLC PDX mediante el kit PrepGEM de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ZyGEM, Solana Beach, CA). Las secuencias de ADN de K-ras se amplifican con KOD polimerasa (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) usando cebadores directos e inversos. Condiciones cíclicas de PCR: 1 ciclo a 75 °C durante 15 minutos, 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos, 1 ciclo a 96 °C durante 1 minuto y 35 ciclos a 96 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 40 segundos, y 1 ciclo a 72 °C durante 1 minuto y 20 segundos. El producto de PCR amplificado de 496 pares de bases se purifica con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA), y la secuenciación de ADN se realiza con el kit BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (ABI, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se muestra en la **Figura 22**, el análisis de secuencia de ADN indica que 37622A1 NSCLC PDX tiene una mutación de glicina en valina (codificada por la

secuencia de ADN GTT) en el aminoácido 13 (G13V) en el gen K-ras humano.

B. Estudios de inhibición del crecimiento *in vivo* para xenoinjertos NSCLC

Se examinan los efectos de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en ratones
5 inmunodeficientes en el crecimiento *in vivo* de xenoinjertos de tumor humano que se
establecieron de fragmentos de tumores NSCLC recién extirpados, obtenidos de
acuerdo con procedimientos de consentimiento adecuados (Asterand). Los
xenoinjertos derivados de pacientes con 87393A1 NSCLC y los xenoinjertos derivados
de pacientes con 37622A NSCLC (en adelante denominados “87393A1 NSCLC PDX”
10 y “37622A1 NSCLC PDX”, respectivamente) se hacen pasar *in vivo* como fragmentos
de animal a animal en ratonas NOD-SCID y lampiñas (Nu/Nu), respectivamente.

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 anti-E. tenella de
15 control. Se suministra una dosis i.p. de modelo 37622A1 NSCLC PDX una vez por
semana durante 3 semanas con 10 mg/kg de anticuerpo 438-mIgG1 de rata y A2, y
anticuerpo anti-E. tenella de control. Se suministra una dosis i.p. de modelo 87393A1
NSCLC PDX dos veces por semana durante 4 semanas con 20 mg/kg de anticuerpo
351-mIgG1 de rata y anti-E. tenella de control. Los tumores se miden por lo menos una
20 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.

La **Tabla 26** muestra la eficacia de anticuerpos 438-mIgG1 de rata y A2 en
25 xenoinjertos derivados de pacientes con 37622A1 NSCLC con mutación G13V en K-
ras en comparación con el anticuerpo anti-E. tenella de control. La inhibición del
crecimiento de 37622A1 PDX mediante 438-mIgG1 de rata indica que NSCLC con
mutaciones y/o Notch1 activado en el oncogén K-ras puede ser sensible a los
inhibidores de la vía de Notch1.

30

Tabla 26. Eficacia de anticuerpos 438-mIgG1 de rata y A2 en xenoinjertos derivados
de pacientes con 37622A1 NSCLC con mutación G13V en K-ras.

	ANTI-E. TENELLA de control					
	Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	Día 16
Volumen del tumor (mm ³)	341,5	547,5	901,0	1128,4	1606,3	1860,5
S.E.M.	40,0	67,1	103,2	151,6	231,3	275,8
	438-mlgG1 de rata					
	Día 0	Día 1	Día 4	Día 8	Día 11	Día 14
Volumen del tumor (mm ³)	336,5	584,5	498,4	429,9	502,5	539,2
S.E.M.	44,6	76,4	81,8	87,1	97,3	126,9
	A2					
	Día 0	Día 1	Día 4	Día 8	Día 11	Día 14
Volumen del tumor (mm ³)	344,3	533,7	523,9	428,7	536,2	622,8
S.E.M.	45,6	72,7	72,1	63,0	117,0	147,5

La **Tabla 27** muestra la eficacia de 351-mlgG1 de rata en 87393A1 NSCLC PDX en comparación con el anticuerpo anti-E. tenella de control. El tratamiento con 351-mlgG1 de rata da como resultado 29 % de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con los tumores tratados con anti-E. tenella de control el día 28.

Tabla 27. Eficacia de 351-mlgG1 de rata en xenoinjertos derivados de pacientes con 87393A1 NSCLC.

	Anti-E. tenella de control					
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 20	Día 26	Día 28
Volumen del tumor (mm ³)	312,4	456,5	596,8	695,6	880,4	836,6
S.E.M.	7,7	37,4	45,6	33,3	61,1	41,8
	351-mlgG1 de rata					
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 20	Día 26	Día 28
Volumen del tumor (mm ³)	275,4	299,5	433,3	466,2	529,5	590,4
S.E.M.	5,1	35,5	57,8	62,2	89,6	93,5

10

Para confirmar la inhibición de la activación de Notch1, se lleva a cabo el análisis de transferencia Western mediante el anticuerpo D3B8 (anti-Notch1^{ICD}) en extractos proteicos generados de xenoinjertos al final del estudio. Al final del estudio se cosechan xenoinjertos del modelo 37622A1 NSCLC PDX tratado con 438-mlgG1 de rata, A2 y anti-E. tenella de control, y xenoinjertos del modelo 87393A1 NSCLC PDX tratado con 351-mlgG1 de rata y anti-E. tenella de control. Se lisa tejido tumoral 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 coctel inhibidor Complete Mini Protease (Roche). Los extractos se resuelven mediante SDS-PAGE en 7,5% de gel de poliacrilamida y se transfieren a papel de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia de iBlot Gel (Invitrogen). Las moléculas Notch1^{ICD} liberadas que empiezan en un residuo de valina se detectan con anticuerpo D3B8 (anti-Notch1^{ICD}), y se detectan niveles totales del dominio del terminal C de Notch1 con D1E11 (anti-Notch1) (Cell Signaling

20

Technologies) mediante procedimientos estándares de transferencia Western. Se muestra β -actina como control de carga.

En la **Figura 23** se muestra el análisis de transferencia Western de extractos proteicos generados de 37622A1 NSCLC PDX tratados con 438-mIgG1 de rata y A2.

5 La detección de Notch1^{ICD} liberado se observa en tumores tratados con anti-E. tenella de control, pero no en tumores tratados con 438-mIgG1 de rata, lo cual indica la inhibición de la activación de Notch1. En la **Figura 24** se muestra el análisis de transferencia Western de extractos proteicos generados de 87393A1 NSCLC PDX tratados con anticuerpos 351-mIgG1 de rata y anti-E. tenella de control. La detección
10 de Notch1^{ICD} liberado se observa en tumores tratados con anti-E. tenella de control, pero no en tumores tratados con 351-mIgG1 de rata, lo cual indica la inhibición de la activación de Notch1.

La información clínica sobre el donante del espécimen original 87393A1 NSCLC PDX indica que el tumor del paciente es un carcinoma pulmonar de células
15 escamosas invasivo poco diferenciado. La involucrina es un marcador para la diferenciación de células escamosas en los tumores pulmonares (Said, J.W., et. al., Laboratore Investigation, 1983, volume 49, 563-568). Para determinar si la inhibición de la activación de Notch1 tiene un efecto sobre la diferenciación de células tumorales 87393A1 NSCLC PDX, se analiza la expresión de involucrina mediante
20 inmunohistoquímica y análisis de transferencia Western. Las **Figuras 25 y 26** muestran la inmunohistoquímica de la involucrina y el análisis de transferencia Western de los tumores tratados con 351-mIgG1 de rata y anti-E. tenella de control, respectivamente. La inhibición de la activación de Notch1 en 87393A1 NSCLC PDX tiene como resultado un incremento de los niveles de expresión de la involucrina,
25 como se demuestra mediante la inmunohistoquímica y el análisis de transferencia Western. Por ello, además de reducir el tamaño del tumor, el tratamiento con anti-Notch1 también aumenta la diferenciación de las células tumorales.

Para determinar si la inhibición de la activación de Notch1 por sí sola influye en el peso corporal, se pesan ratones durante estudios de eficacia *in vivo*. La **Tabla 28**
30 muestra que los pesos corporales promedio de los ratones (menos los pesos de los tumores) de los grupos tratados con anticuerpo 351-mIgG de rata y anti-E. tenella de control, a lo largo del estudio, no fueron significativamente diferentes en 87393A1 NSCLC PDX.

35 **Tabla 28.** Pesos corporales promedios de los ratones (menos los pesos de los

tumores) en 87393A1 NSCLC PDX después de tratamiento con 351-mlgG1 de rata.

Pesos corporales promedios de ratón en gramos (menos pesos corporales)					
Anticuerpo	Día 0	Día 7	Día 14	Día 20	Día 26
Anti-E. tenella de control	23,9	23,1	23,4	23,3	22,9
351-mlgG1 de rata	23,4	23,0	23,1	23,3	23,5

C. Estudios de inhibición del crecimiento *in vivo* para xenoinjertos HPB-ALL

Se llevan a cabo experimentos similares *in vivo* con la línea celular HPB-ALL de Notch1 mutante como se realizó con 37622A1 NSCLC PDX y 87393A1 NSCLC PDX anteriormente. Para generar xenoinjertos, (Nu/Nu) se implanta subcutáneamente células 8×10^6 HPB-ALL en Matrigel 50% (BD Biosciences) en ratonas lampiñas. Cuando los tumores alcanzan un volumen de 200 a 400 mm³, se los escalona a efectos de asegurar la uniformidad de la masa tumoral entre varios grupos de tratamiento antes de la administración de anticuerpos anti-Notch1 y D16A de control. Se suministra una dosis s.c. de modelo HPB-ALL con 20 mg/kg de anticuerpo 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata, A2 o D16A, 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 las masas medias de los tumores ($\pm$ SEM) para cada grupo de tratamiento, y se comparan con el grupo de control tratado.

La **Tabla 29** muestra la eficacia de los anticuerpos 438-mlgG1 de rata, 351-mlgG1 de rata y A2 en xenoinjertos de HPB-ALL con mutación L1575P en Notch1 NRR. Los datos muestran que el tratamiento con 438-mlgG1 de rata y el tratamiento con 351-mlgG1 de rata inhiben el crecimiento *in vivo* de las células HPB-ALL en comparación con el anticuerpo D16A de control, y por lo tanto, retarda el crecimiento tumoral.

Tabla 29. Eficacia de los anticuerpos 351-mlgG1 de rata, 438-mlgG1 de rata y A2 en xenoinjertos de HPB-ALL con mutación L1575P en Notch1 NRR.

	D16A de control					
	Día 0	Día 1	Día 4	Día 8	Día 11	Día 14
Volumen del tumor (mm ³)	175,3	201,9	261,2	522,0	735,9	1003,4
S.E.M,	6,4	4,4	11,4	44,1	82,3	162,2
	351-mlgG1 de rata					
	Día 0	Día 1	Día 4	Día 8	Día 11	Día 14
Volumen del tumor (mm ³)	166,1	198,6	244,1	267,0	231,0	251,0
S.E.M,	8,3	5,5	12,0	21,6	21,3	36,2
	438-mlgG1 de rata					
	Día 0	Día 1	Día 4	Día 8	Día 11	Día 14
Volumen del tumor (mm ³)	165,1	194,7	225,0	244,3	176,9	179,2

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 (mm ³)	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*.

- 5 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
- 10 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
- 15 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

20 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

25 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 (3 mg/kg)	250±29	362±58	465±88	742±127	888±171	1279±219
438 (10 mg/kg)	263±26	383±40	448±51	566±68	667±87	904±129
438 (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

Para determinar si la inhibición de la señalización de Notch1 por sí sola influye en el peso corporal, se pesan ratones durante estudios de eficacia *in vivo*. La **Tabla 31** muestra que los pesos corporales promedio de los ratones (menos los pesos de los tumores) de los grupos tratados con anticuerpo 4381-mlgG1 de rata y A2, y con anti-E. tenella de control, a lo largo del estudio, no fueron significativamente diferentes.

Tabla 31. Pesos corporales promedios de los ratones (menos los pesos de los tumores) de los tratamientos con 438-mlgG1 de rata y A2, y con anti-E. tenella de control en el modelo Calu-6 (n=10-11).

	Día 6	Día 9	Día 13	Día 16	Día 19
E. tenella (10 mg/kg)	24,6±1,56	25,2±1,42	24,3±1,64	24,7±1,74	24,0±1,77
438-mlgG1 (3 mg/kg) de rata	24,5±2,18	25,8±1,74	25,8±1,67	26,4±1,60	25,7±1,66
438-mlgG1 (10 mg/kg) de rata	25,1±2,06	25,1±2,21	24,6±1,88	25,1±1,71	24,5±1,54
438-mlgG1 (30 mg/kg) de rata	24,7±2,21	25,7±2,10	25,2±2,48	25,8±2,18	25,3±2,23
A2 (3 mg/kg)	24,7±2,39	26,1±2,06	26,1±2,05	27,1±1,99	26,4±1,82
A2 (10 mg/kg)	24,5±1,63	25,2±1,74	25,1±1,86	25,3±1,79	24,7±1,69
A2 (30 mg/kg)	25,8±1,61	26,4±1,54	26,2±1,73	26,8±1,99	26,0±2,07

E. Estudios de inhibición del crecimiento *in vivo* de xenoinjertos de cáncer de mama

Los efectos de 438 VH1.1/VL1.8 humanizado se examinan en el crecimiento *in vivo* en los modelos de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo, Sum149 y MDA-MB-231. Las ratonas atímicas (Nu/Nu, 6-8 semanas) se obtienen de Charles River Laboratories y se alojan en condiciones específicas libres de patógenos, de acuerdo con las directivas de la Association for the Assessment and Accreditation for Laboratory Animal Care, International. Los animales reciben alimento estéril para roedores y agua *ad libitum*.

Las células para implantar en ratones atímicos se cosechan y convierten en pelets mediante centrifugación a 450Xg durante 5-10 minutos. Los pelets celulares se lavan una vez y se vuelven a suspender en medio estéril libre de suero. Las células tumorales se enriquecen con Matrigel 50% (BD Biosciences) para facilitar la captación del tumor y el crecimiento de células tumorales seleccionadas como xenoinjertos. Las células ($2-3 \times 10^6$ en 100 μ L) se implantan de manera subcutánea en la región del flanco de la pata del ratón y se permite que crezcan hasta alcanzar el tamaño designado antes de la administración del compuesto para cada experimento.

Para la eficacia antitumoral, los animales que tienen tumores de 150-300 mm³ de tamaño se dividen aleatoriamente en grupos que reciben anticuerpo de control (26H6) o 438 VH1.1/VL1.8 humanizado y se les suministra dosis mediante inyección

s.c. semanalmente. Se suministra dosis de Docetaxel mediante inyección i.p. semanalmente. Las mediciones de los tumores se obtienen cada 2-3 días. El volumen del tumor (mm³) se mide con capilares Vernier y se calcula mediante la siguiente fórmula: longitud (mm) x ancho (mm) x ancho (mm) x 0,52, como se indica en las

5 **Tablas 32 y 33.**

Tabla 32. Eficacia de 438 VH1.1/VL1.8 humanizado en modelo de xenoinerto de cáncer de mama triple negativo, SUM149.

Volumen medio del tumor (mm ³)				
Día después del implante	Vehículo + 26H6	Docetaxel, 6 mgk I.P. semanalmente	438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 5 mgk S.C. semanalmente	438 VH1.1/VL1.8 humanizado + Docetaxel
36	220	225	214	223
41	266	239	166	181
46	408	282	153	149
49	543	486	150	125
53	529	458	135	104
56	711	587	177	144
60	796	638	179	129
63	937	769	239	187
67	1271	962	244	185
SE				
Día después del implante	Vehículo + 26H6	Docetaxel, 6 mgk I.P. semanalmente	438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 5 mgk S.C. semanalmente	438 VH1.1/VL1.8 humanizado + Docetaxel
36	8	6	8	6
41	12	7	6	9
46	21	18	16	12
49	34	45	18	9
53	38	39	17	10
56	45	41	19	14
60	68	44	18	12
63	100	53	23	24
67	125	62	22	26

10 **Tabla 33.** Eficacia de 438 VH1.1/VL1.8 humanizado en modelo de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231

Volumen medio del tumor (mm ³)				
Día después del implante	Vehículo + 26H6	Docetaxel, 10 mgk I.P. semanalmente	438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 5 mgk S.C. semanalmente	438 VH1.1/VL1.8 humanizado + Docetaxel
50	413	431	409	428
52	462	478	510	441
57	697	535	451	339
62	1204	717	466	354
65	1716	1326	694	506
69	2291	1396	768	486
SE				
Día después del implante	Vehículo + 26H6	Docetaxel, 10 mgk I.P. semanalmente	438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 5 mgk S.C. semanalmente	438 VH1.1/VL1.8 humanizado + Docetaxel
50	33	25	21	21
52	38	30	22	26
57	45	33	25	17
62	62	41	27	30

65	145	109	69	56
69	216	128	73	34

Los valores de inhibición porcentuales (%) se miden el día final del estudio para los ratones tratados con el fármaco en comparación con los ratones tratados con el vehículo, y se calculan como $100 - \{1 - [(\text{Tratado}_{\text{Día final}} - \text{Tratado}_{\text{Día 1}}) / (\text{Control}_{\text{Día final}} - \text{Control}_{\text{Día 1}})]\}$. Para todos los experimentos de inhibición del crecimiento tumoral, se usan de 8 a 10 ratones por grupo de dosis. Se usa la prueba *t* de Student para determinar el valor *P*. La **Tabla 34** muestra la eficacia de 438 VH1.1/VL1.8 humanizado en modelo de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo.

10 **Tabla 34.** Eficacia de 438 VH1.1/VL1.8 humanizado y en modelo de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo.

Modelo de tumor	Agente	%TGI
Sum149	Vehículo +26H6	0
	Docetaxel, 6 mpk	30
	438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 5 mgk	97
	438 VH1.1/VL1.8 humanizado + Docetaxel	104
MDA-MB-231	Vehículo +26H6	0
	Docetaxel, 10 mpk	49
	438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 5 mgk	81
	438 VH1.1/VL1.8 humanizado + Docetaxel	97

Ejemplo 10

15 Efecto de anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en la diferenciación y proliferación de células intestinales

La inhibición farmacológica y genética de la señalización de Notch convierte a las células progenitoras proliferativas dentro de las criptas intestinales en células caliciformes secretoras (van Es et al., Nature 435:959-963, 2005). Se examinan los efectos de los anticuerpos inhibidores anti-Notch1 en la proliferación y diferenciación de células en el intestino de ratón en tejidos recolectados de estudios de eficacia Calu-6 y 87393A1 NSCLC PDX del Ejemplo 9. La inmunohistoquímica mediante tinte azul Alcian para las mucinas (es decir, células caliciformes secretoras) y anti-Ki67 para la proliferación se lleva a cabo en muestras intestinales.

Se recolectan intestinos delgados de ratón de estudios de eficacia Calu-6 y 87393A1 NSCLC PDX, se los recorta longitudinalmente, se fijan en formalina y se mantienen en ETOH al 70 %. Luego, se incrusta el tejido en parafina. Se lleva a cabo un tinte con azul Alcian para las mucosustancias de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se lleva a cabo la inmunohistoquímica mediante un anticuerpo anti-Ki67 (SP6, Abcam, Cambridge, MA) en un Dako Auto Stainer (Dako, Carpinteria, CA) para demostrar la proliferación celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1. Captura de imágenes

Se escanean secciones de tejido teñidas en un Nanozoomer Slide Scanner (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) con configuración 20Xobj. Se escanean las imágenes y se las guarda en formato ndp. Se abren las imágenes virtuales en software Aperio Image Scope (Aperio Technologies, Vista, CA). Se capturan dos imágenes de lados opuestos del lumen intestinal con un aumento virtual de 10X, y se guardan como imágenes Tiff.

La **Figura 27** muestra la identificación histoquímica de células caliciformes secretoras mediante el uso de teñido con azul Alcian en la sección del íleo de los intestinos de ratón del estudio de eficacia Calu-6 tratado con 10 mg/kg de anticuerpo 438-mIgG1 de rata, A2 o anti-E. tenella de control. Se muestran imágenes representativas de vellosidades y criptas intestinales. Las células caliciformes se indican con flechas, y para mayor simplicidad, solo se resalta una célula en cada imagen como ejemplo. Aunque los anticuerpos anti-Notch1 no causan pérdida de peso durante el estudio, el tratamiento con 438-mIgG1 de rata o A2 induce la diferenciación de las células caliciformes secretoras, como lo indica el aumento del teñido con azul Alcian en las vellosidades y en las criptas. Por ello, la inhibición de la señalización de Notch1 por sí sola aumenta la diferenciación de células caliciformes; sin embargo, no lo hace hasta un nivel que tiene un impacto considerable en el peso corporal.

2. Análisis de las imágenes

Se abren las imágenes virtuales en software Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, MD). Se crea un área de interés de contorno manual (AOI) que incluye el tejido intestinal (cripta y vellosidades), pero que excluye los músculos lisos, artefactos, pliegos y escombros. Se crea un umbral para identificar el área de teñido con azul Alcian y el área del tejido. Se aplican los umbrales a los AOI, y se exportan las estadísticas de rango a una planilla Excel. En Excel, se calcula una relación de teñido con azul Alcian para cada animal a partir de las dos relaciones de teñido recolectadas, a fin de proveer una única relación de teñido con azul Alcian calculada por cada animal. Para cada grupo se crean una relación media de teñido con azul Alcian y la desviación estándar. Se realizan estadísticas mediante el software estadístico JMP (JMP, Cary, NC).

La **Tabla 35** muestra una cuantificación de imagen de la relación de teñido con azul Alcian de intestinos de ratón tratados con anticuerpos 438-mIgG1 de rata y A2, y

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 tñido 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 tñido con azul Alcian

5 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 tñido con azul Alcian de intestinos de ratón tratados con anticuerpos 438-mlgG1 de rata y A2, y con

10 anti-E. tenella de control en el estudio de eficacia Calu-6.

Grupo de tratamiento	Relación de tñido con azul Alcian	S.E.M.
ANTI-E. TENELLA, 10mg/kg	2,71	0,23
438, 3mg/kg	3,97	0,59
438, 10mg/kg	7,64	0,79
438, 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 tñido 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

15 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 tñido 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 tñido con azul Alcian en comparación con la

20 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 tñido 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	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

t	Alpha						
438-mlgG1 de rata 3mpk	6,512037	4,002516	0,619362	-0,14848	-0,23884	-3,81524	-2,39216
Anti E-tenella 10mpk	7,942685	5,433165	2,05001	1,2746	1,191806	-2,39216	-3,48282

La **Figura 28** muestra la inmunohistoquímica anti-Ki67 en criptas intestinales de ratón del estudio de eficacia de Calu-6, tratadas con 10 mg/kg de anticuerpos 438-mlgG1 de rata, A2 o anti-E. tenella de control. Se muestran imágenes representativas de las criptas intestinales teñidas con Ki67. El teñido con Ki67 se reduce en la base de las criptas en los animales tratados con 438-mlgG1 de rata, pero no en los animales tratados con anti-E. tenella de control. La pérdida de células proliferativas de criptas teñidas con Ki67 coincidió con la conversión en células caliciformes posmitóticas observadas mediante el teñido con azul Alcian.

En la **Tabla 37** se muestra una cuantificación de imagen de relación de teñido con azul Alcian de intestinos de ratón tratados con anticuerpos 351-mlgG1 de rata y anti-E. tenella de control en el estudio de eficacia 87393A1 NSCLC PDX. En comparación con el anti-E. tenella de control, no hay una diferencia significativa en la relación de teñido con azul Alcian en los ratones tratados con 351-mlgG1 de rata ($p = 0,22$). El análisis de imagen cuantitativa del teñido con azul Alcian indica que 351-mlgG1 de rata no induce la hiperplasia de las células caliciformes como otros inhibidores de la vía de Notch. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de Notch1 con 351-mlgG1 de rata no aumenta la diferenciación de células caliciformes.

Tabla 37. Cuantificación de la relación de teñido con azul Alcian de intestinos de ratón tratados con 351-mlgG1 de rata y anti-E. tenella en un estudio de eficacia 87393A1 NSCLC PDX.

	351-mlgG1 de rata	Anti-E. tenella
Relación de teñido con azul Alcian	3,06	2,53
Desviación estándar	0,61	0,81

La **Figura 29** y la **Tabla 38** muestran la inmunohistoquímica anti-Ki67 y la cuantificación de la relación de teñido con Ki67 en las criptas intestinales de ratón del estudio de eficacia 87393A1 NSCLC PDX tratado con anticuerpos 351-mlgG1 de rata o anti-E. tenella de control. La **Figura 29** muestra imágenes representativas de criptas intestinales teñidas con Ki67, lo que indica que el teñido con Ki67 se reduce en la base de las criptas en los animales tratados con 351-mlgG1 de rata, pero no en los animales tratados con anti-E. tenella de control.

De manera coherente con esta observación, en la **Tabla 38** se muestra la

cuantificación de imagen de las relaciones de teñido con Ki67 de los intestinos de ratón tratados con anticuerpos 351-mIgG1 de rata y anti-E. tenella de control. Los datos indican que hay una disminución pequeña, pero estadísticamente significativa ($p = 0,023$) en las relaciones de teñido con Ki67 en 351-mIgG1 de rata en comparación con los tratamientos con anticuerpo anti-E. tenella de control. El análisis cuantitativo de las relaciones de teñido con Ki67 muestra una disminución en la proliferación de las células en la base de las criptas, como se muestra mediante una reducción de los niveles relativos del teñido con Ki67 en una región más grande del íleo en comparación con la región que se muestra en los paneles superiores de la **Figura 19**. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de Notch1 con 351-mIgG1 de rata disminuye la proliferación.

Tabla 38. Cuantificación de la relación de teñido con Ki67 en las criptas intestinales de ratón de 87393A1 NSCLC PDX tratadas con anticuerpos 351-mIgG1 de rata y anti-E. tenella de control.

	351-mIgG1 de rata	Anti-E. tenella
Relación de teñido con Ki67	5,66	7,39
Desviación estándar	0,34	1,47

Ejemplo 11

Farmacocinética y farmacodinámica de anticuerpo inhibidor anti-Notch1

1. Procedimiento de yodación

La yodación se lleva a cabo mediante el método IODO-PERLAS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL). En pocas palabras, se utilizan ~200 µg de artículo de prueba por 2 mCi de ¹²⁵Iodo (Perkin-Elmer) y se incuban durante 15-25 minutos a temperatura ambiente con 2 IODO-PERLAS y ~200 µL de PBS. Se separa la mezcla reactiva del IODO-PERLAS mediante filtración (Centricon-10 de Millipore, Billerica, MA).

2. Preparación y caracterización de la solución de dosificación

Para 438-mIgG1 de rata, se prepara una solución de dosificación mezclando el artículo de prueba no etiquetado de 438-mIgG1 de rata, una cantidad mínima de artículo de prueba etiquetado con ¹²⁵I y un tampón de formulación (PBS) para una concentración proteica final de 2 mg/mL, a fin de permitir un volumen de dosificación de 10 mL/kg en ratones. Para 351-mIgG1 de rata, se preparan tres soluciones de dosificación mezclando artículo de prueba no etiquetado de 351-mIgG1 de rata, una cantidad mínima de artículo de prueba etiquetado con ¹²⁵I y un tampón de formulación

(PBS) para una concentración proteica final de 2, 0,5 y 2,4 mg/mL para permitir un volumen de dosificación de 2,5, 10 y 12,5 mL/kg en ratones para el grupo I (5 mg/kg i.v.), II (5 mg/kg i.p.) y III (30 mg/kg i.p.), respectivamente.

La fracción de radioactividad en una solución de dosificación corresponde a
5 iodo libre (“% de iodo libre”) y se determina mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Las alícuotas de solución de dosificación (5 µL) se mezclan con suero de ratón (45 µL) y se hace el recuento (por triplicado) de la radioactividad total (Model 1480 WIZARD™, Wallac Inc., Gaithersburg, MD o Modelo 2470 Perkin Elmer, Waltham MA). Se añade TCA (50 µL de reserva al 20%) a las muestras. Las muestras
10 se centrifugan a aproximadamente 3.000 g durante 10 minutos. Se cuenta una alícuota de 50 µL de sobrenadante resultante para establecer conteos solubles por minuto (cpm). Se calcula la fracción de iodo libre en la solución de dosificación mediante la siguiente fórmula: $[2 * \text{elución soluble promedio cpm} / \text{elución total promedio cpm} * 100\%]$. Se calcula la actividad específica la solución de dosificación mediante la
15 siguiente fórmula; $[\text{total promedio cpm} - 2 * \text{soluble promedio cpm}] / [\text{concentración de la solución de dosificación (mg/mL)} * \text{volumen de la solución de dosificación (mL)} * 2.200.000 \text{ cpm}/\mu\text{Ci}]$. También se analiza cualitativamente la pureza de la solución de dosificación mediante SDS-PAGE y se confirma como una banda predominantemente única en condiciones no reductoras y como bandas dobles en
20 condiciones reductoras.

3. Determinación de concentraciones equivalentes radiactivas en suero y tejidos

La radioactividad total en las muestras de suero (50 µL, en duplicado) se determina mediante conteo gamma. Se añade un volumen equivalente de 20% TCA
25 en cada alícuota de suero, y se centrifugan las muestras a ~12000 rpm durante 10 minutos. La radioactividad soluble de TCA en 50 µL de una alícuota de sobrenadante se determina mediante conteo gamma. La radioactividad precipitable de TCA (cpm) en una muestra dada (cpm Total- 2*TCA-soluble cpm), la actividad específica de la solución de dosificación (precipitable TCA cpm por mg de proteína), así como también
30 los datos de las mediciones de las muestras (tS) y de la solución de dosificación (tD) se utilizan para calcular la concentración del artículo de prueba en una muestra dada, mediante la siguiente fórmula: $[\text{TCA promedio-cpm precipitable} / \text{EXP}(-0,693/60.2 * (tS - tD))] / [\text{actividad específica (en cpm/mg)} * \text{volumen de muestra (en mL)}]$.

La cuantificación de la concentración de tejido equivalente radiactivo (µg eq./g)
35 del artículo de prueba etiquetado con ¹²⁵I se basa en la radioactividad total en los

tejidos y la actividad específica de la solución de dosificación después de una corrección de la vida media de ^{125}I mediante la siguiente fórmula: $[\text{cpm de la muestra}/\text{EXP}(-0,693/60.2 \times (tS - tD))]/[\text{actividad específica (en cpm/mg)} \times \text{peso de la muestra (en mg)}]$. No se lleva a cabo la precipitación de TCA para las muestras de
5 tejido. Las relaciones de concentración entre tejido y suero (T/S) para la muestra de tejido en un punto temporal determinado se calculan mediante la relación de la concentración de equivalente radioactivo en el tejido ($\mu\text{g eq./g}$) y en el suero ($\mu\text{g eq./mL}$).

10 4. Cálculos farmacocinéticos

Los cálculos farmacocinéticos se basan en las concentraciones medias de suero o tejido en ratones. Se utiliza un módulo de análisis no compartimental (Model 201 y 200 para el análisis de datos de suero después de la administración IV e IP, respectivamente) del paquete de software farmacocinético WinNonlin, ver. 5.1
15 (Pharsight). El área bajo la curva de concentración de suero en función del tiempo (AUC) se calcula mediante el método trapezoidal lineal. Se calcula la pendiente de la fase terminal aparente mediante regresión lineal logarítmica mediante por lo menos tres puntos de datos, y se deriva la constante del coeficiente terminal (λ) a partir de la pendiente. Se calcula $\text{AUC}_{0-\infty}$ como la suma de AUC_{0-t} (donde t es el tiempo de la
20 última concentración medible) y C_t/λ . Se calcula que la vida media ($t_{1/2}$) terminal aparente es de $0,693/\lambda$.

La **Tabla 39** muestra las exposiciones de suero y tejido de ratones lampiños que no tienen tumor a los anticuerpos 438-mIgG1 de rata que se midieron en los puntos temporales indicados después de una sola inyección i.p. de 5 mg/kg de
25 anticuerpo 438-mIgG1 de rata etiquetado con ^{125}I odo. Se hallaron concentraciones más altas de equivalente radiactivo (RE) y exposición ($\text{AUC}_{0-\text{INF}}$) en el suero en todos los puntos temporales analizados, seguido por hígado, piel, riñón, intestino grueso, intestino delgado, pulmones y ojos. La radiactividad en los tejidos disminuye con el tiempo, como se indica en la **Tabla 39**. A pesar de la expresión conocida y el rol
30 esencial de la señalización de Notch1 en el tracto gastrointestinal de los ratones, 438-mIgG1 de rata no se acumuló preferentemente en los intestinos gruesos o delgados en comparación con otros tejidos evaluados.

Tabla 39. Concentraciones en suero y tejido de anticuerpo 438-mIgG1 de rata
35 etiquetado con ^{125}I odo después de una sola inyección i.p. de 5 mg/kg a los ratones

lampiños.

	1 hora	3 horas	6 horas	24 horas	72 horas	120 horas	168 horas	240 horas	336 horas
Suero	4855± 5992	16439± 9789	15834± 1287	6640±539	2983±886	1618±332	1006±291	690±129	111±147
Ojos			832±141	302±22	155±41	142±36	46,0±40,6		
Riñón			2121±375	798±95	486±235	373±166	216±40		87,4±8,8
Intestino grueso			2093±156	514±107	154±46	94,2±16,9	54,9±0,8		
Hígado			7590±925	1677±225	704±501	541±158	322±59		97,9±61,1
Pulmón			1047±633	227±111	253±149	178±46	124±100		25,3±14,8
Piel			2688±429	1688±192	513±30	430±160	171±54		70,3±46,0
Intestino delgado			1855±232	353±78	195±40	114±18	55,1±6,5		16,0±9,6

Se calculan las relaciones de concentraciones entre tejido y suero, y las relaciones medias de concentración de tejido/suero después de una sola dosis i.p. de 5 mg/kg de 438-mlgG1 de rata a los ratones lampiños se muestran en la **Tabla 40**. Las relaciones de concentraciones entre tejido y suero siguen siendo relativamente constantes en los puntos temporales analizados, lo cual indica un equilibrio entre el suero y los tejidos. Las concentraciones en suero de 438-mlgG1 de rata son mayores que las concentraciones de tejido, de manera que las relaciones T/S son menores (<1 en general) y dentro del rango típico observado para mlgG1.

Tabla 40. Relaciones medias de concentración de tejido/suero después de una sola dosis i.p. de 5 mg/kg de 438-mlgG1 de rata a los ratones lampiños.

	6 horas	24 horas	72 horas	120 horas	168 horas
Ojos	0,053±0,007	0,046±0,001	0,052±0,004	0,092±0,034	0,056±0,058
Riñón	0,133±0,016	0,121±0,022	0,158±0,035	0,224±0,053	0,220±0,028
Intestino grueso	0,133±0,012	0,077±0,010	0,052±0,003	0,059±0,006	0,058±0,020
Hígado	0,478±0,023	0,255±0,053	0,212±0,127	0,331±0,040	0,332±0,064
Pulmón	0,065±0,036	0,034±0,016	0,086±0,044	0,117±0,051	0,123±0,079
Piel	0,172±0,040	0,256±0,045	0,185±0,067	0,269±0,103	0,173±0,033
Intestino delgado	0,117±0,008	0,053±0,007	0,067±0,007	0,071±0,008	0,057±0,014

Después de la administración de 438-mlgG1 de rata etiquetado con ¹²⁵I, se calcula que Cmax es de 16,4 µg eq./mL, con un Tmax logrado en 3 h. El t1/2 de eliminación es de 58 h, y la exposición (AUC0-∞) es de 788 µg eq.* h/mL, como se indica en la **Tabla 41**. La vida media de 438-mlgG1 de rata después de una sola dosis i.p. de 5 mg/kg es relativamente corta (~ 2,4 d).

Tabla 41. Parámetros farmacocinéticos de anticuerpo inhibidor anti-Notch1 438-mlgG1 de rata en ratonas lampiñas después de una sola dosis i.p. de 5 mg/kg.

Cmax (µg/mL)	Tmax (h)	t1/2 (h)	AUClast (h*µg/mL)	AUC0-inf (h*µg/mL)	AUC0-inf/Dose (h*kg*µg/mL/mg)	AUC Extrap (%)	MRT (h)
16,4	3	58	779	788	158	1,2	67

Nota: Los parámetros PK se generaron de concentraciones medias en plasma (n=3 por punto temporal)

Las exposiciones en suero de 351-mlgG1 de rata se miden en ratones lampiños que no tienen tumores después de una sola inyección de 5 mg/kg i.v, 5 mg/kg i.p. o de 30 mg/kg i.p. de anticuerpo 351-mlgG1 de rata etiquetado con ¹²⁵I. Se utilizan los valores de concentración de suero observados para calcular múltiples parámetros farmacocinéticos, como se muestra en las **Tablas 42 y 43**.

En la **Tabla 42** se muestran parámetros farmacocinéticos después de administración i.v. de 5 mg/kg de 351-mlgG1 de rata etiquetado con ¹²⁵I a ratonas lampiñas. El t_{1/2} de eliminación y la depuración sistémica de 351-mlgG1 de rata son ~3 días (70,2 h) y 1,74 mL/h/kg, respectivamente. El volumen de distribución en estado constante (Vdss) es de 177 mL/kg. La expresión (AUC₀-INF) es de 2871 µg eq.h/mL.

Tabla 42. Parámetros farmacocinéticos de 351-mlgG1 de rata etiquetado con ¹²⁵I en ratonas lampiñas después de administración i.v. de una única dosis de 5 mg/kg dosis.

Dosis mg/ kg	C ₀ µg eq./mL	AUC _{0-último} µg eq.h/mL	AUC _{0-∞} µg eq.h/mL	AUC _{0-∞} /Dosis µgeq.*h/mL /mg/kg	AUC%Extrap %	t _{1/2} h	CL mL/h /kg	Vdss mL/kg
5	50,6	2766	2871	574	3,68	70,2	1,74	177

En la **Tabla 43** se muestran parámetros farmacocinéticos después de la administración i.p. de 5 y 30 mg/kg de 351-mlgG1 de rata etiquetado con ¹²⁵I a ratonas lampiñas. El C_{max} es de 30 y 151 µg eq./mL, respectivamente, y se logra el T_{max} a las 6 horas para ambos grupos de dosis. El t_{1/2} de eliminación es de 93 y 163 horas (~4-7 días) y la exposición (AUC₀-INF) es de 2754 y 24080 µg eq.*h/mL, después de 5 y 30 mg/kg, respectivamente. La relación normalizada de dosis AUC (F) entre las administraciones i.p. e i.v. es ~1,4, lo cual sugiere que la absorción después de la administración i.p. de 30 mg/kg se ha completado en los ratones.

Tabla 43. Parámetros farmacocinéticos de anticuerpo 351-mlgG1 etiquetado con ¹²⁵I en ratonas lampiñas después de administración i.p. de 5 mg/kg y 30 mg/kg.

Dosis mg/ kg	C _{max} µg eq./mL	T _{max} h	T _{1/2} h	AUC _{0-último} µg eq.*h/ mL	AUC _{0-∞} µg eq.* h/ mL	AUC _{0-∞} /Dosis µg eq.* h/ mL/mg/kg	AUC %Extrap %	MRT hs	F %
5	29,7	6	93,2	2572	2754	551	6,64	117	95,9
30	151	6	163	18687	24080	803	22,4	221	completo

Se miden las exposiciones en suero y tejido de ratones lampiños que no tienen tumores a 351-mlgG1 de rata después es de una sola inyección i.p. de 5 y 30 mh/kg

de 351-mlgG1 de rata etiquetado con ^{125}I . Para la dosis i.p. de 5 mg/kg, las máximas concentraciones equivalentes radioactivas (RE) y la exposición (AUC0-INF) se hallan en el suero en todos los puntos temporales observados, seguido por hígado, bazo, piel, riñones, intestino delgado, intestino grueso, pulmones y ojos, como se muestra en la **Tabla 44**. Para la dosis i.p. de 30 mg/kg, las máximas concentraciones equivalentes radioactivas (RE) y la exposición (AUC0-INF) se hallan en el suero en todos los puntos temporales observados, seguido por hígado, piel, bazo, intestino delgado, pulmón, riñón, ojos e intestino grueso, como se muestra en la Tabla 45. Los datos muestran que 351-mlgG1 de rata no se acumuló preferentemente en los intestinos gruesos o delgados en comparación con otros tejidos evaluados para las dosis ip. de 5 mg/kg y 30 mg/kg.

Tabla 44. Concentraciones medias en tejido y suero ($\mu\text{g eq./g}$ tejido) de 351-mlgG1 de rata etiquetado con ^{125}I en ratones lampiños después de una sola dosis i.p. de 5 mg/kg (n=3 por punto temporal).

Tiempo, horas	6	24	72	120	168	240	336
Ojos	920	631	510	439	235	162	75
Riñones	2052	1167	1128	1029	304	229	89
Intestino grueso	1147	545	378	316	131	99	41
Hígado	12228	3417	1223	1135	501	599	140
Pulmón	990	1294	1264	726	183	464	193
Piel	2761	3435	2023	1480	665	430	192
Intestino delgado	1888	767	459	389	171	144	50
Bazo	2897	1411	1189	888	349	323	103
Suero	29664	16894	12303	9014	4724	2858	1359

Tabla 45. Concentraciones medias en tejido y suero ($\mu\text{g eq./g}$ tejido) de 351-mlgG1 de rata etiquetado con ^{125}I en ratones lampiños después de administración de i.p. de 30 mg/kg (n=3 por punto temporal).

Tiempo, horas	6	24	72	120	168	240	336
Ojos	8451	9733	3733	2183	2534	1899	1223
Riñones	9423	6487	8693	2722	4870	4315	967
Intestino grueso	5225	3175	2644	1448	1133	968	493
Hígado	56856	20363	11979	5497	4843	3614	1456
Pulmón	10237	7091	2496	1749	2902	3002	1925
Piel	22323	17707	15125	8381	7287	4439	3011
Intestino delgado	10496	4505	3523	1956	1956	1491	638
Bazo	14353	6805	7346	3314	3454	3135	1111
Suero	150928	101971	80782	53137	46925	35299	22982

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
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 SEQ ID NO: 71.
2. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
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: 97.
3. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
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
como se muestra en SEQ ID NO: 71, y
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
como se muestra en SEQ ID NO: 97.
4. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que
comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena
pesada que tiene una identidad de por lo menos 90% con SEQ ID NO: 71.
5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una
secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena pesada como se
indica en SEQ ID NO: 71.
6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que
comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena
liviana que tiene una identidad de por lo menos 90% con SEQ ID NO: 97.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una
secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena liviana como se
indica en SEQ ID NO: 97.
8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que
comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que tiene una
identidad de por lo menos 90% con SEQ ID NO: 111.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende una
secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:
111.
10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que

- comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que tiene una identidad de por lo menos 90% con SEQ ID NO: 113.
11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana como se indica en SEQ ID NO: 113.
12. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
una secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena pesada que tiene una identidad de por lo menos 90 % con SEQ ID NO: 71; y
una secuencia de aminoácidos variable de la cadena liviana que tiene una identidad de por lo menos 90 % con SEQ ID NO: 97.
13. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
una secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 71; y
una secuencia de aminoácidos variable de la cadena liviana como se indica en SEQ ID NO: 97.
14. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que tiene una identidad de por lo menos 90% con SEQ ID NO: 111; y
una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que tiene una identidad de por lo menos el 90% con SEQ ID NO: 113.
15. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 111; y
una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana como se indica en SEQ ID NO: 113.
16. Un anticuerpo que se liga a Notch1 y que compete para ligarse a Notch1 con el anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3.
17. Un anticuerpo o porción de ligación a antígeno, que se liga a Notch1, en donde el anticuerpo se liga a un epítipo que comprende por lo menos 7 residuos de aminoácido seleccionados de 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, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 y Leu 1718.
18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde dicho anticuerpo es una molécula de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, o deriva de ellas.

19. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el anticuerpo es un IgG, que tiene una subclase seleccionada del grupo consistente en IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄, o deriva de ellas.
20. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la subclase deriva de IgG₁.
21. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
22. Un ácido nucleico que comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO: 112.
23. Un ácido nucleico que comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO: 114.
24. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-23.
25. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 24.
26. Un proceso para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 25 y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.
27. Una célula huésped que produce de manera recombinante el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
28. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y un portador farmacéuticamente aceptable.
29. Un método para tratar en un trastorno en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 28.
30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho trastorno se asocia con la activación anormal de Notch1.
31. El método de acuerdo con las reivindicaciones 29 o 30, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama en un sujeto que lo necesita.
32. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para usar en terapia.
33. El uso de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para la fabricación de un medicamento.

34. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 32 o 33, en donde dicho uso es para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama en un sujeto que lo necesita.
- 5 35. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
una secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 115; y
una secuencia de aminoácidos variable de la cadena liviana como se indica en SEQ ID NO: 129.
- 10 36. Un anticuerpo que se liga a Notch1, que comprende:
una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 149; y
una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana como se indica en SEQ ID NO: 151.
- 15 37. Un anticuerpo que se liga a Notch1 humano, en donde el anticuerpo se liga a un epítipo que comprende por lo menos 8 residuos de aminoácido seleccionados de 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 y Lys 1718.
- 20 38. Un anticuerpo que 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 activo
- 25 39. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-38 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 40. Un método para tratar un trastorno en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-38 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 39.
- 35 41. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde dicho trastorno se asocia con la activación anormal de Notch1.
42. El método de acuerdo con las reivindicaciones 40 o 41, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo consistente en leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) y

cáncer de mama en un sujeto que lo necesita.

43. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-38 para usar en terapia.

44. El uso de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-38 para la fabricación de un medicamento.

5

45. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 43 o 44, en donde dicho uso es para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama en un sujeto que lo necesita.

10

RESUMEN

La presente invención provee anticuerpos que se ligan a Notch1. La presente revelación también provee métodos para preparar los anticuerpos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos y métodos para el tratamiento de

5 trastornos con los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas.

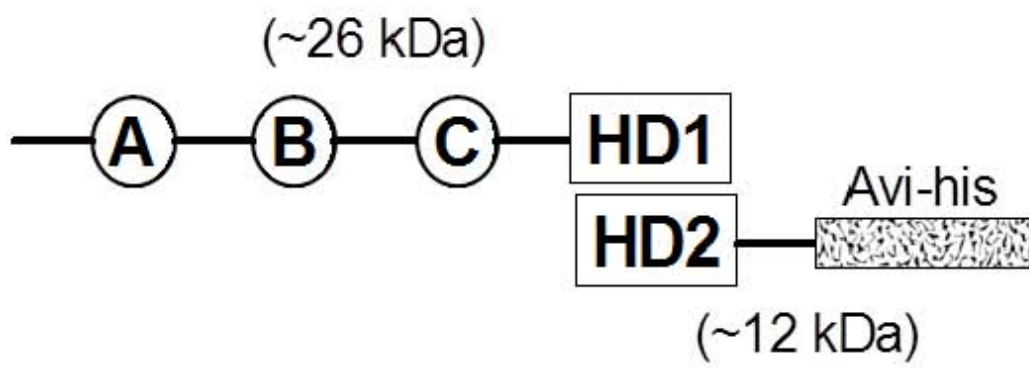
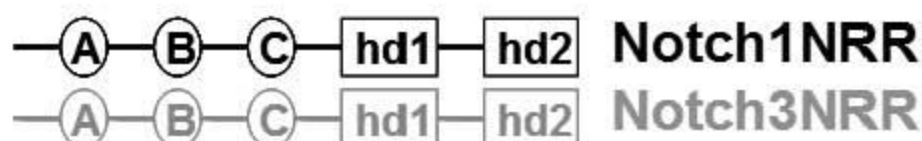
FIG. 1

FIG. 2

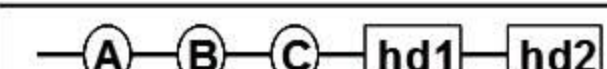
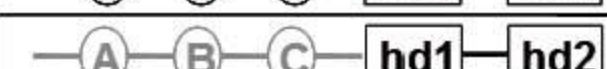
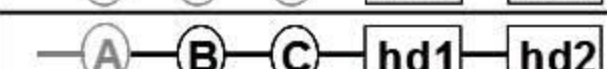
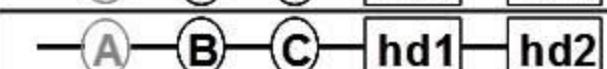
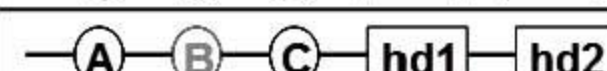
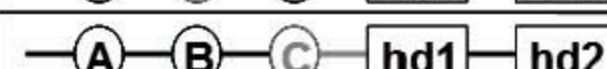
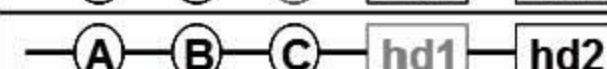
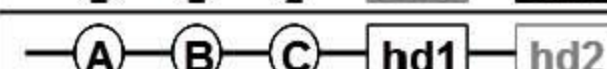
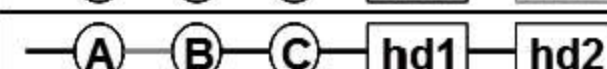
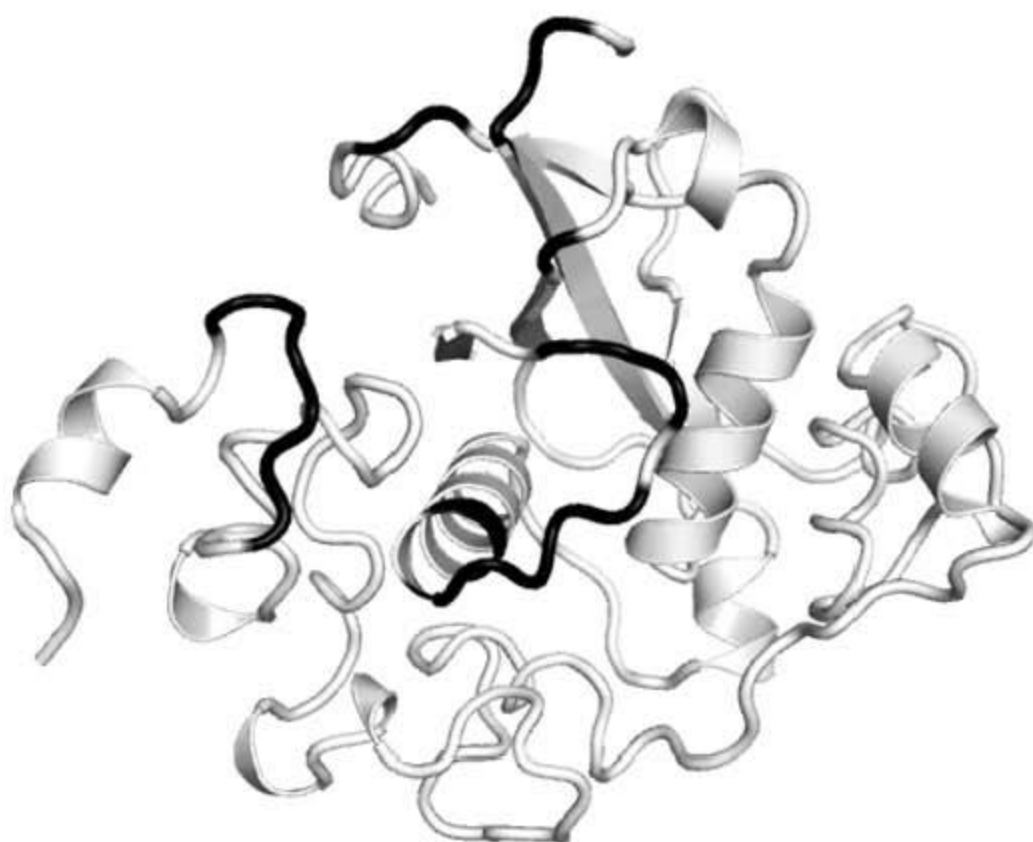
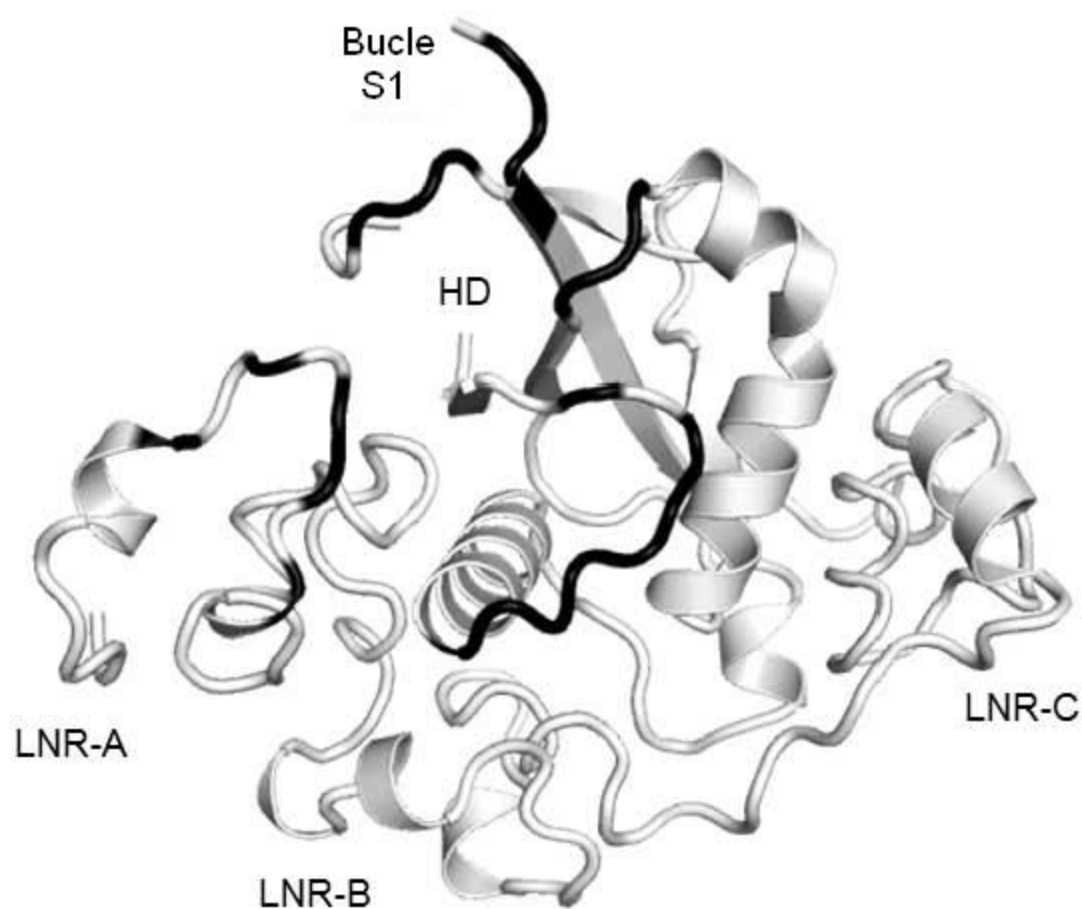
Anti Notch1:	351- mlgG1 de rata	438- mlgG1 de rata	A2
	57	51	75
	40	1	1
	78	6	2
	56	2	6
	20	15	6
	55	47	70
	34	29	50
	0	0	0
	60	53	83

FIG. 3

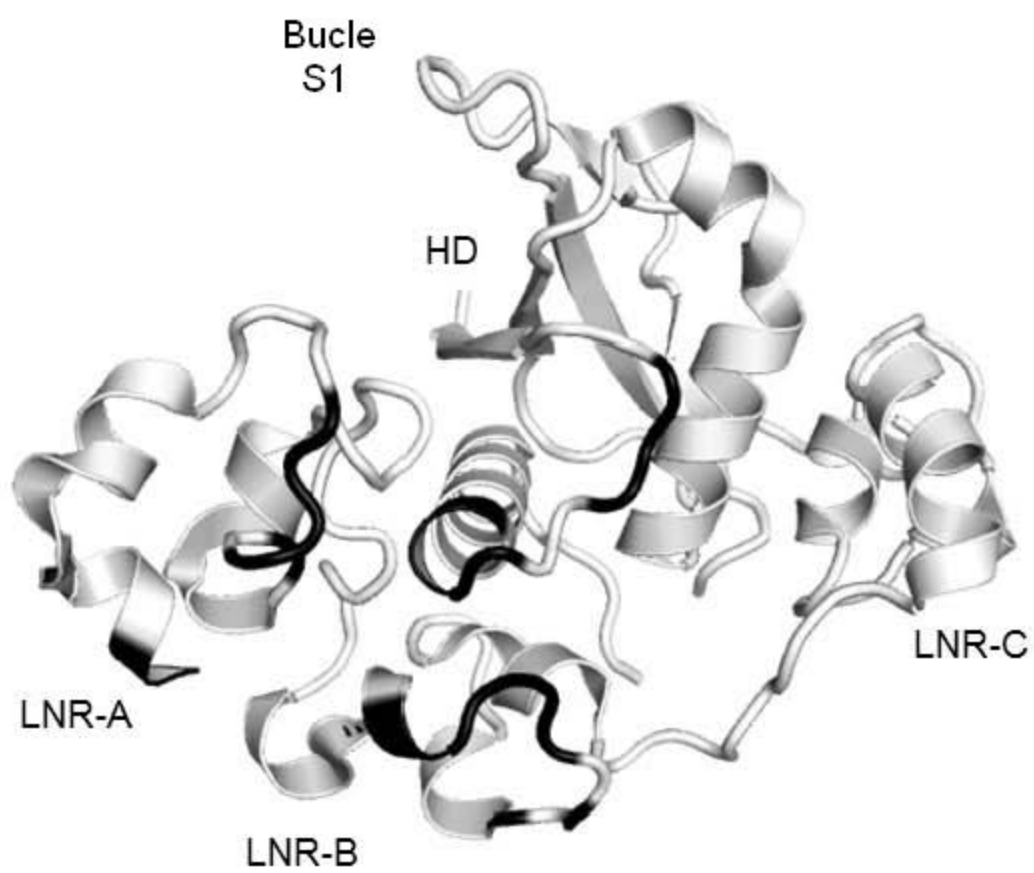


Epítotope 438 de rata en Notch1 NRR humano

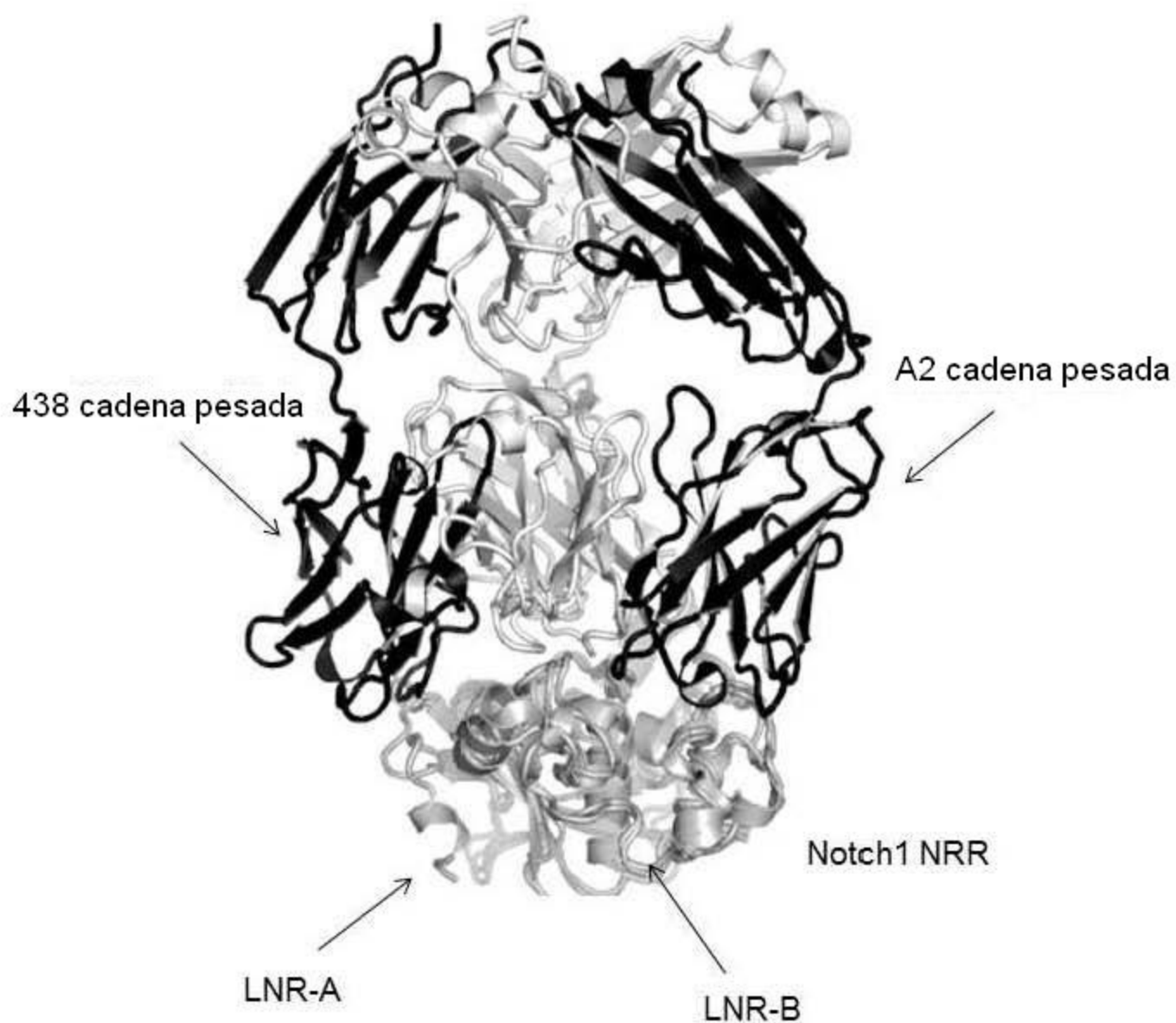
FIG. 4

Epítoto 351 de rata en Notch1 NRR humano

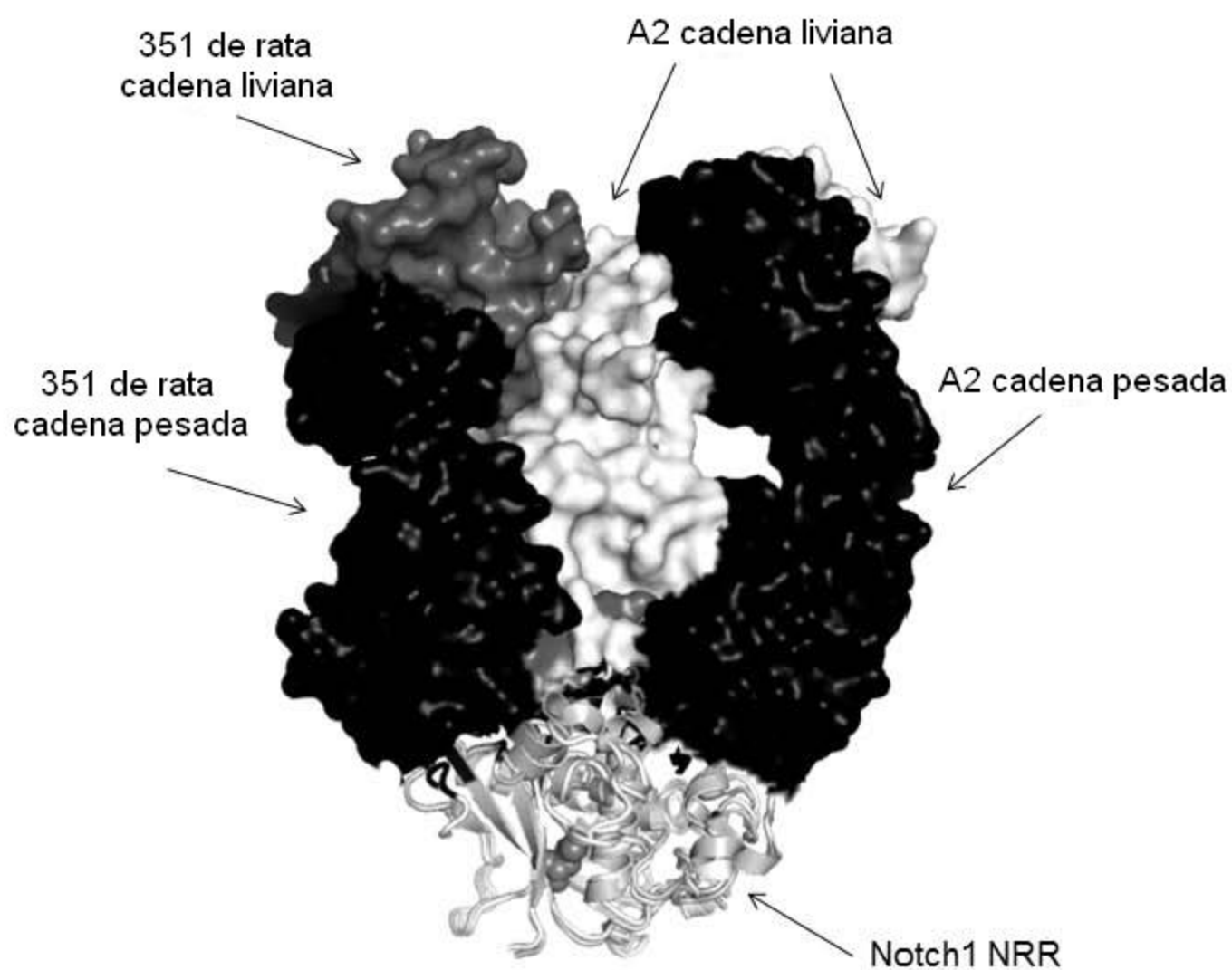
FIG. 5



Epítoto A2 en Notch1 NRR humano

FIG. 6

**Superposición de las estructuras de Notch1
NRR humano ligado a A2 y 438 de rata**

FIG. 7

**Superposición de las estructuras de Notch1
NRR humano ligado a A2 y 351 de rata**

FIG. 8

Actividad de neutralización de 438 VH1.1/L1.8 humanizado, 438-mIgG1 de rata y anticuerpos A2 contra la señalización de Notch1 humano

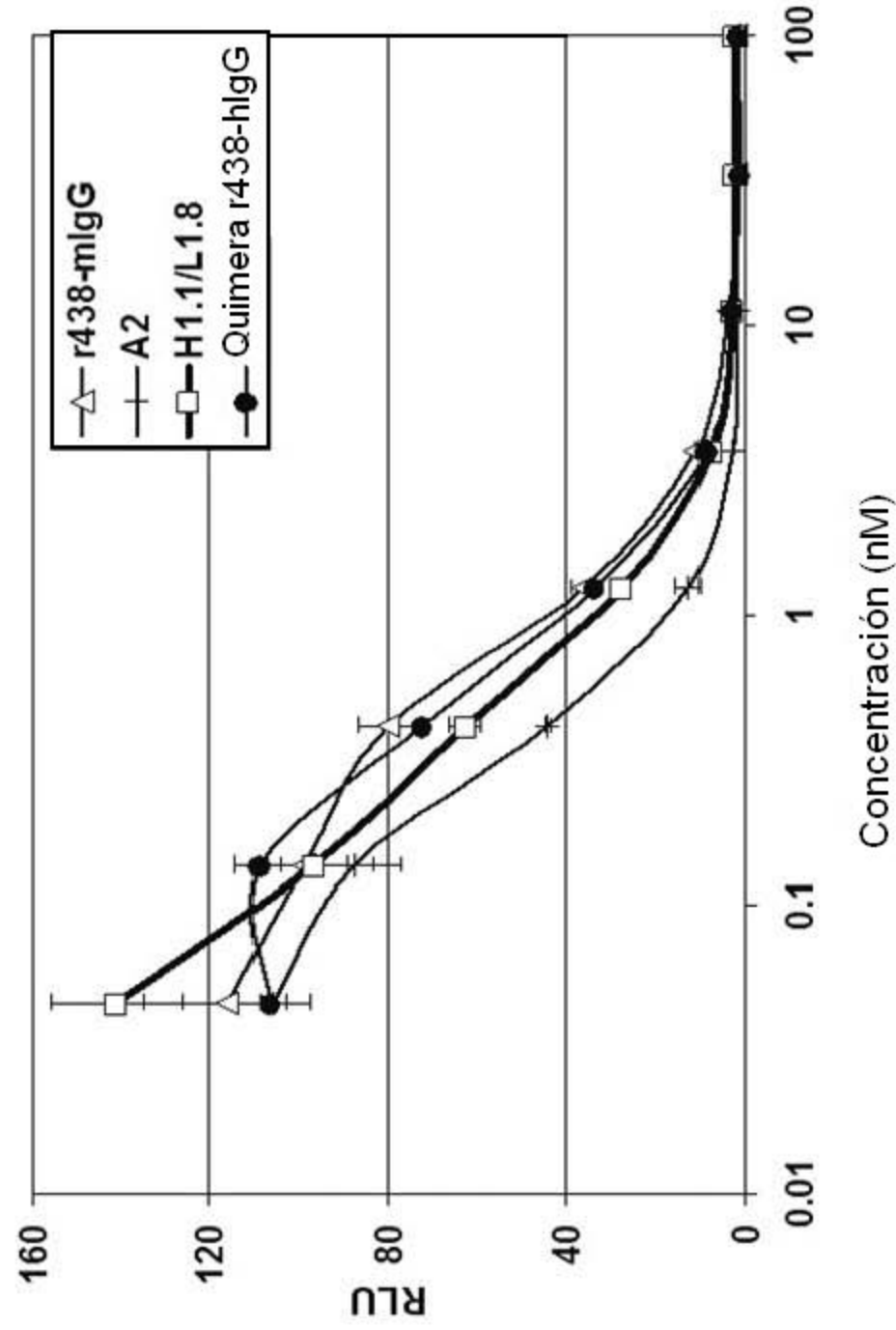


FIG. 9

Actividad de neutralización de 438 VH1.1/VL1.8 humanizado, 438-mIgG1 de rata y anticuerpos A2 contra la señalización de Notch1 murino

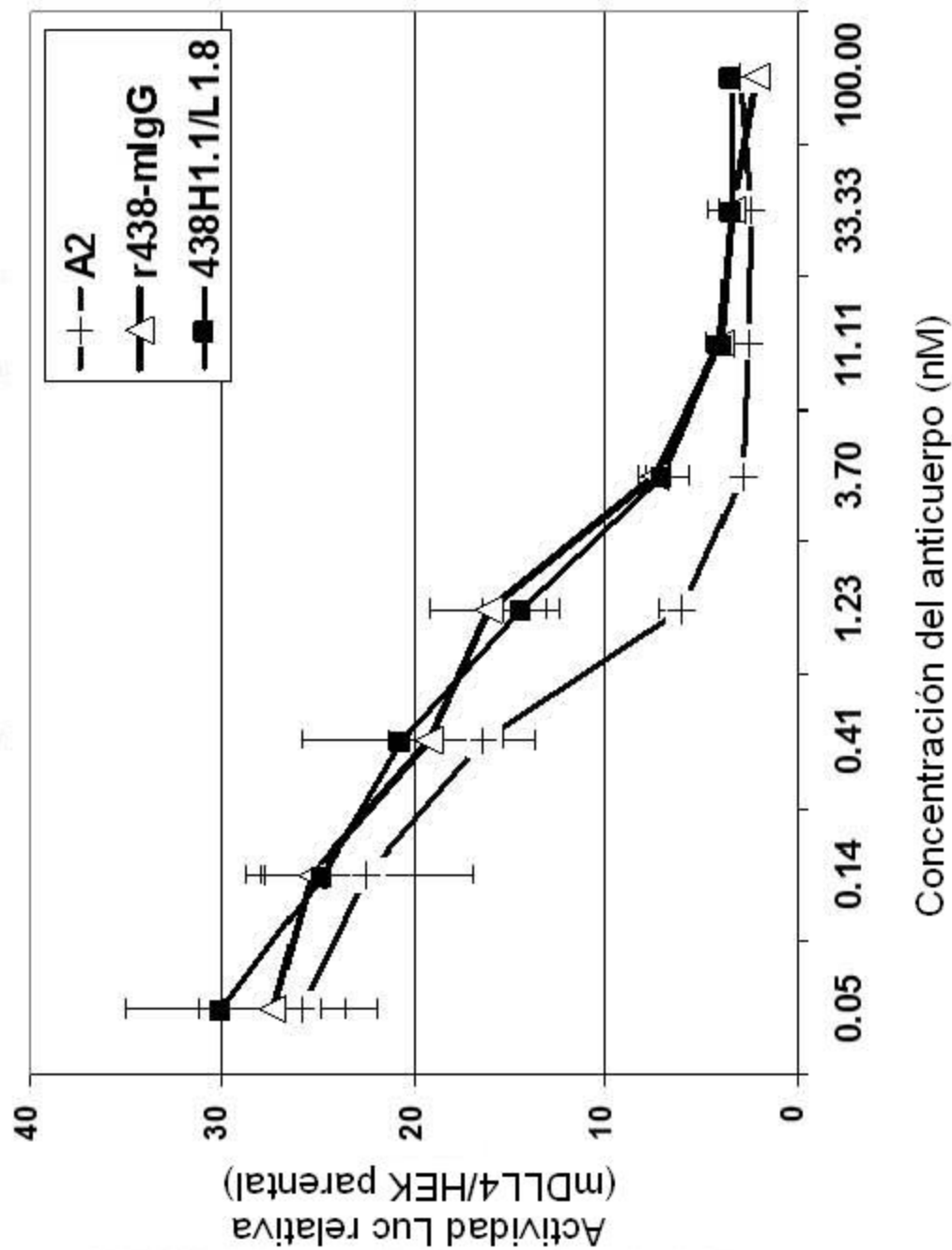
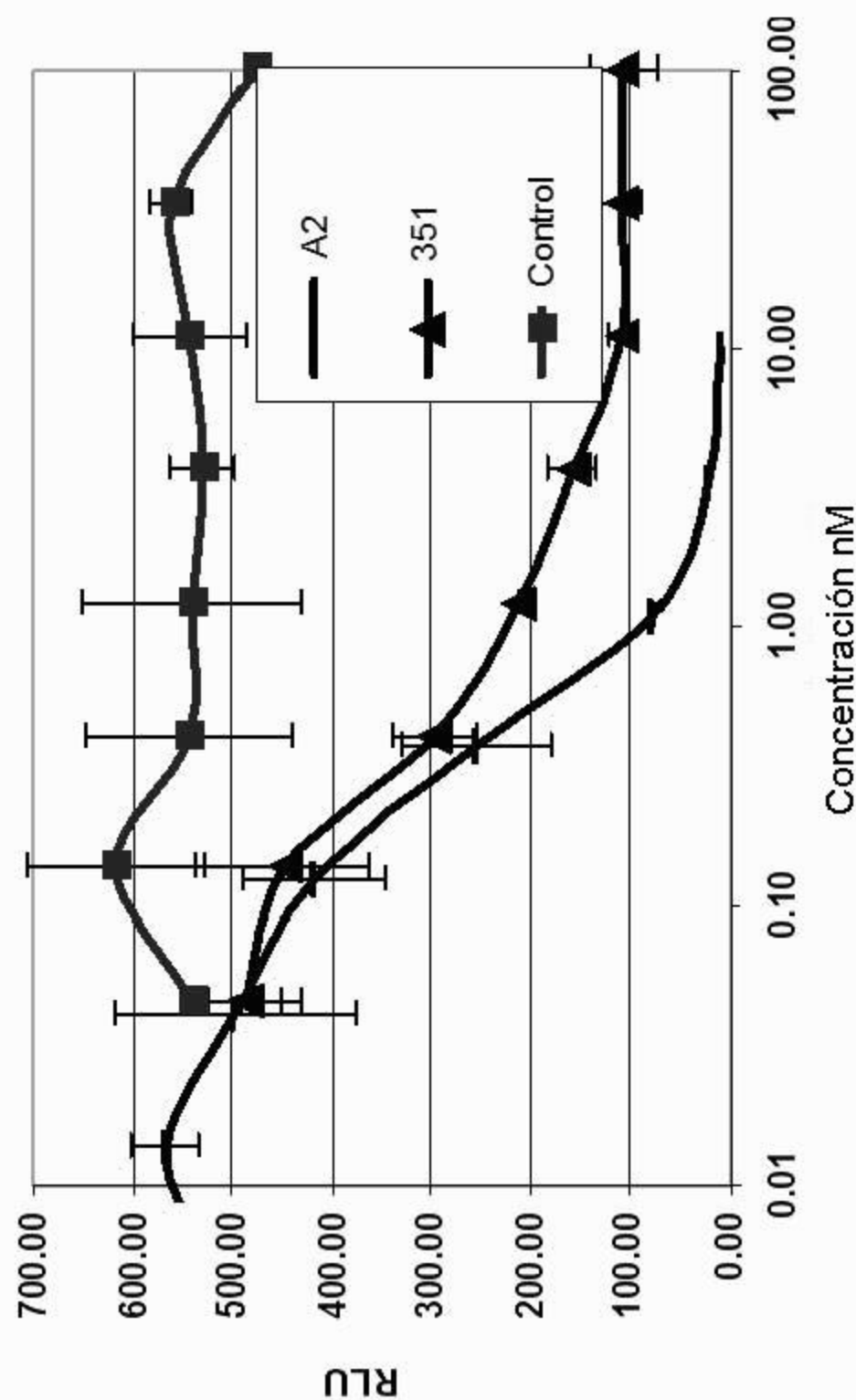


FIG. 10

Actividad de neutralización de anticuerpos A2 y 351 de rata contra la señalización de Notch1 humano



Actividad de neutralización de anticuerpos A2 y 351 de rata
contra la señalización de Notch1 de ratón

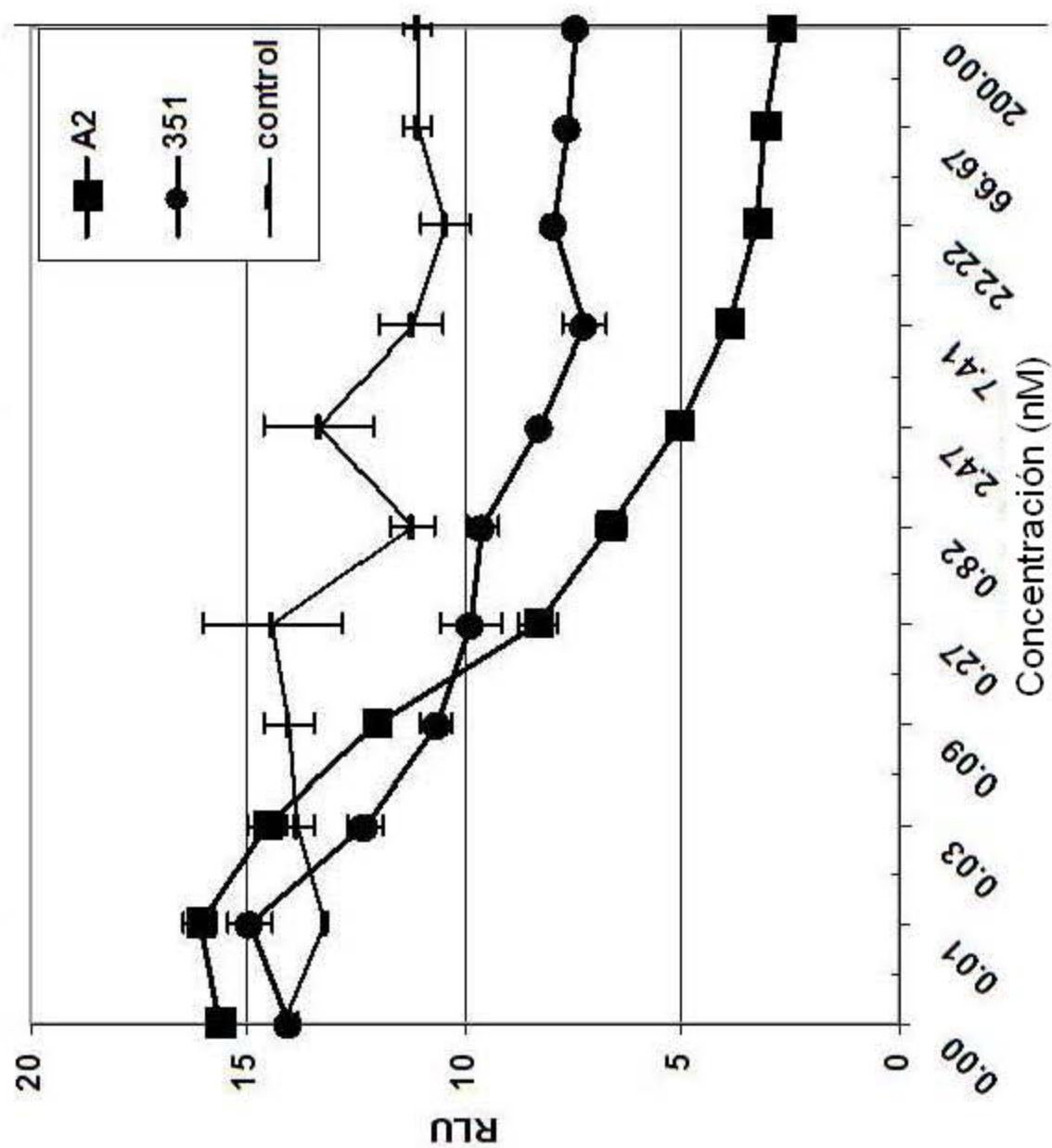


FIG. 11

FIG. 12

Actividad de neutralización de variantes 351 humanizado, anticuerpos A2 y 351-mIgG1 de rata contra la señalización de Notch1 humano

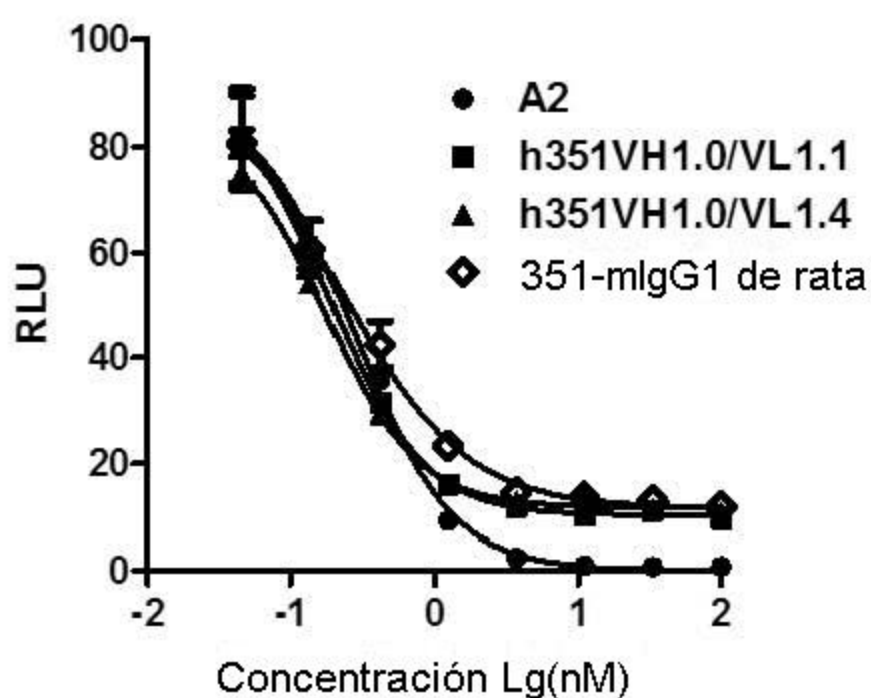
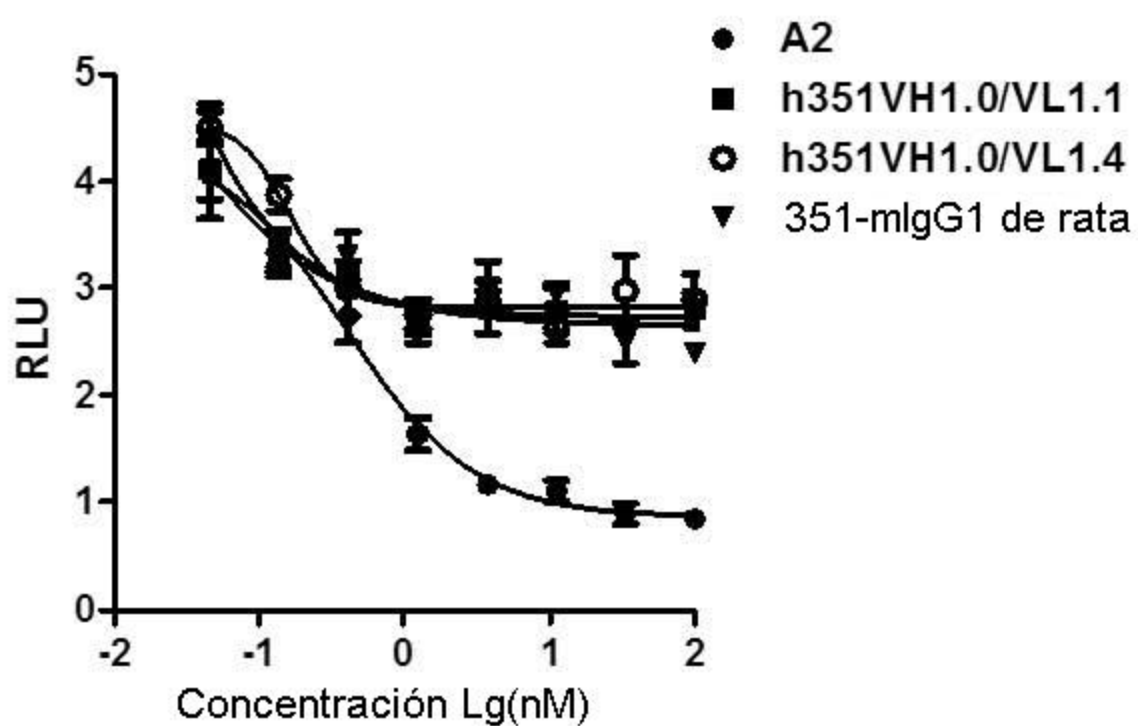
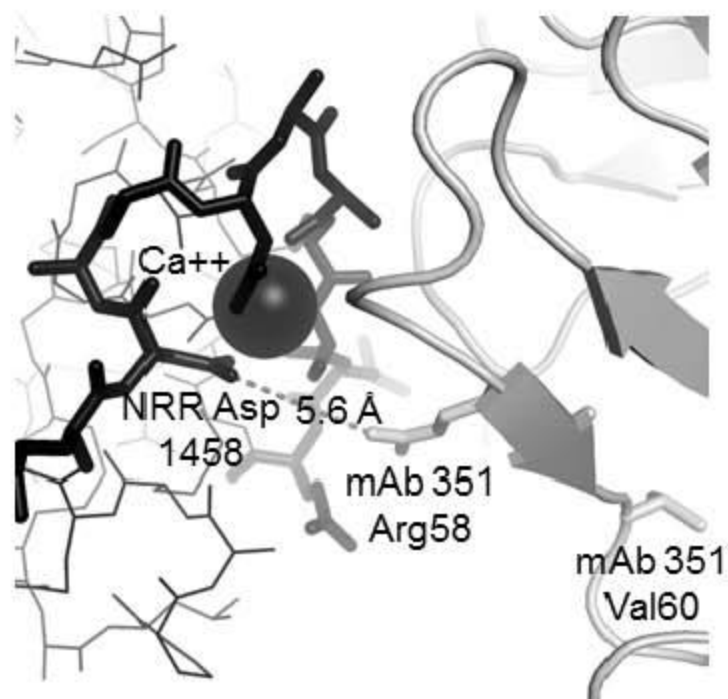


FIG. 13

Actividad de neutralización de variantes 351 humanizado, anticuerpos A2 y 351-mIgG1 de rata contra la señalización de Notch1 humano



Interacción LNR-A/cadena pesada en el Complejo 1

FIG. 14A

Interacción LNR-A/cadena pesada en el Complejo 2

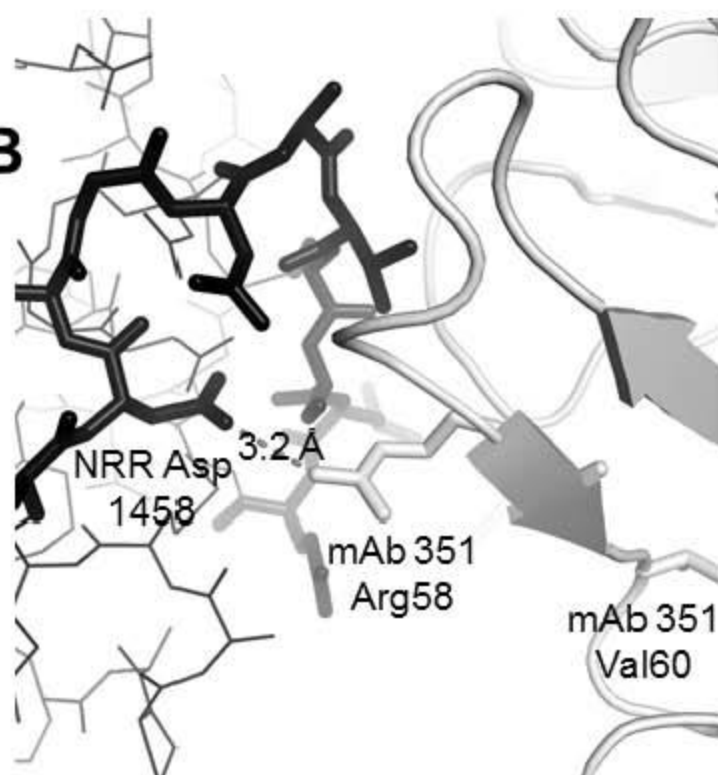
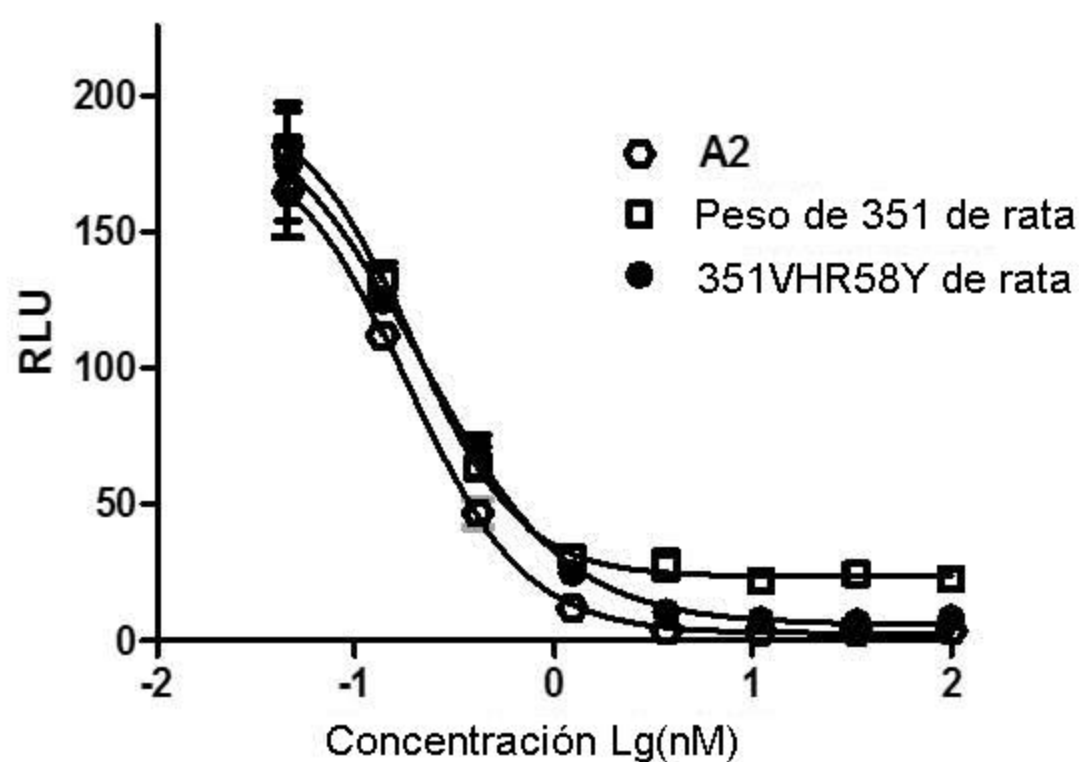
FIG. 14B

FIG. 15

Actividad de neutralización de 351 de rata, 351 de rata mutante y A2 en ensayos de gen informante de cocultivo



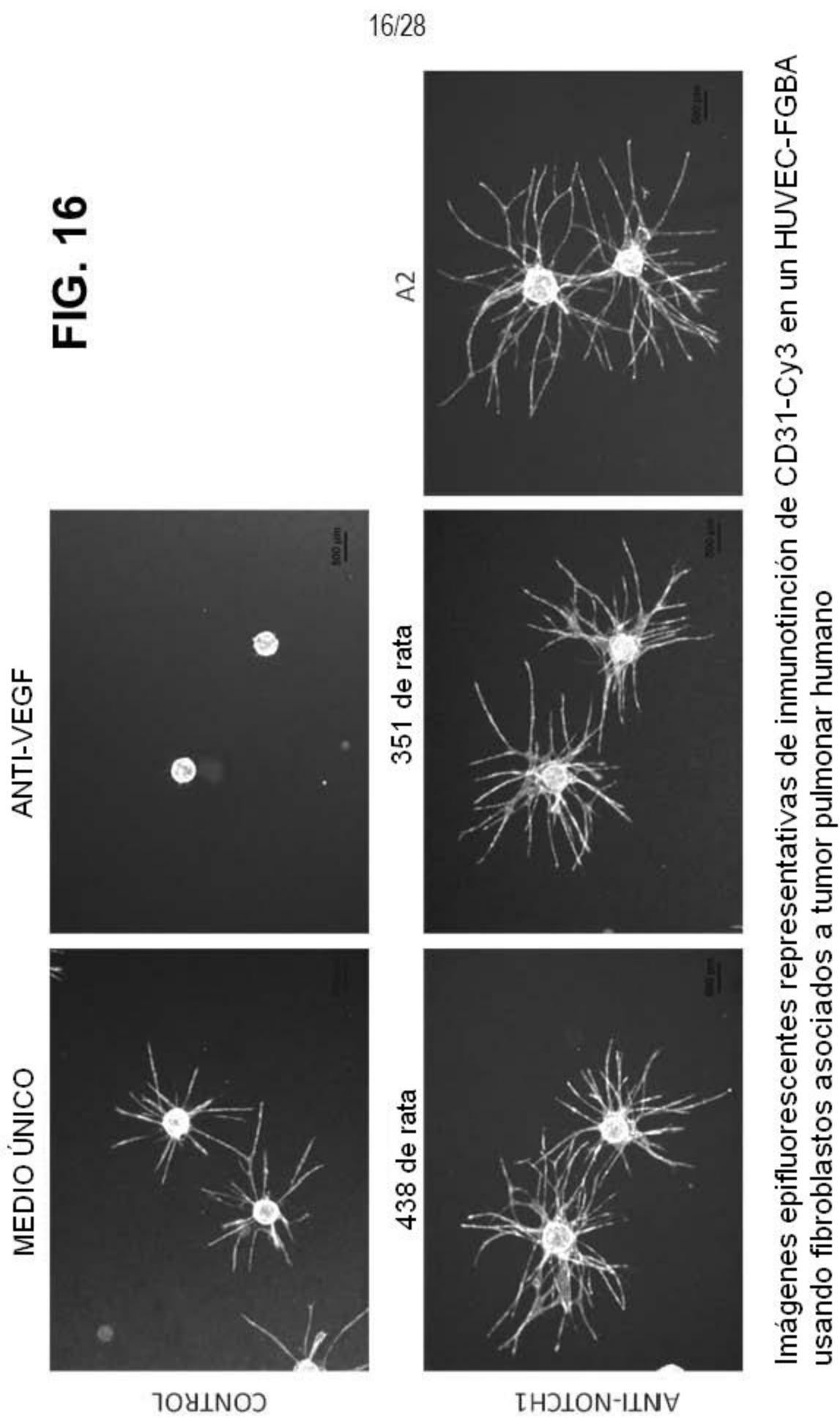
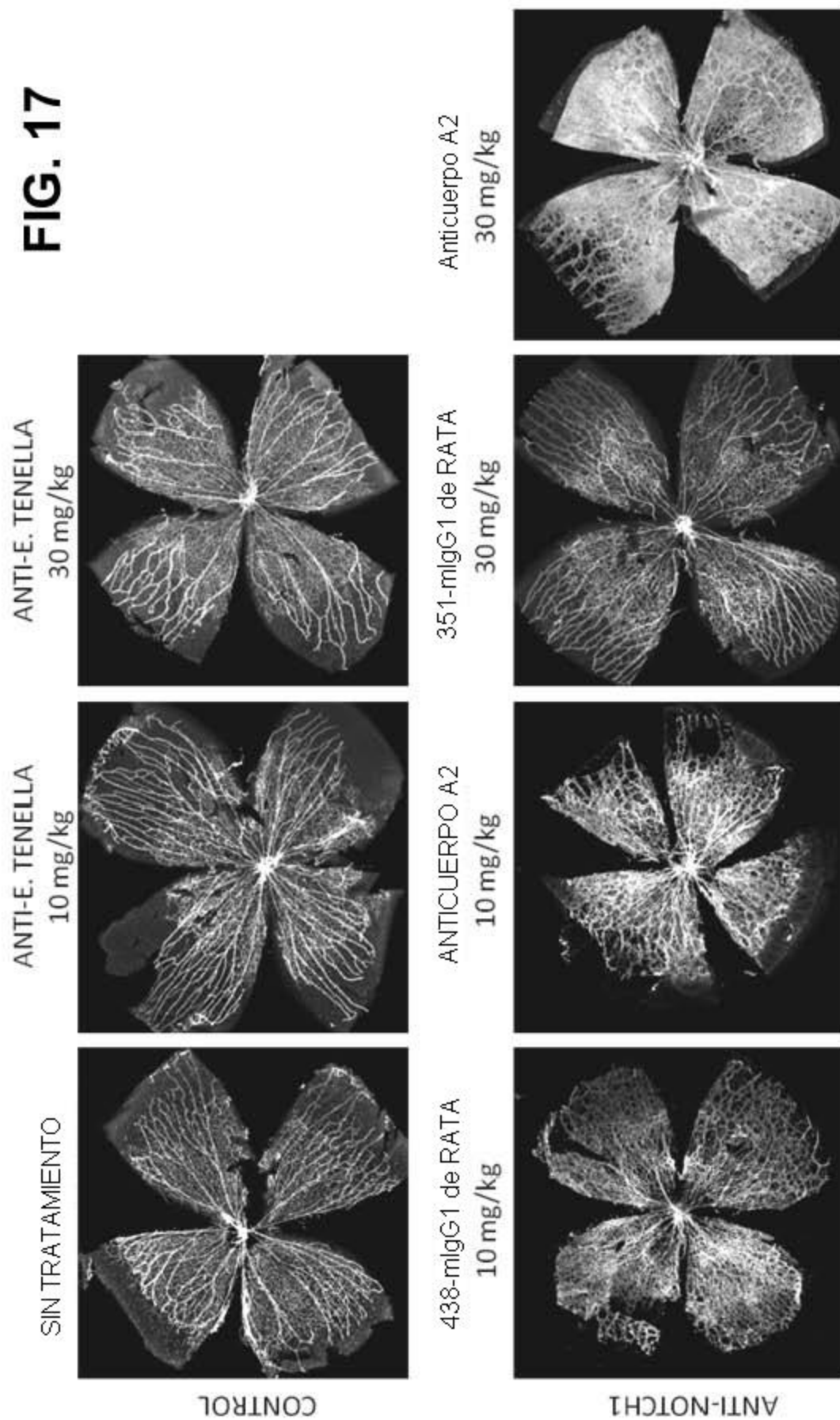
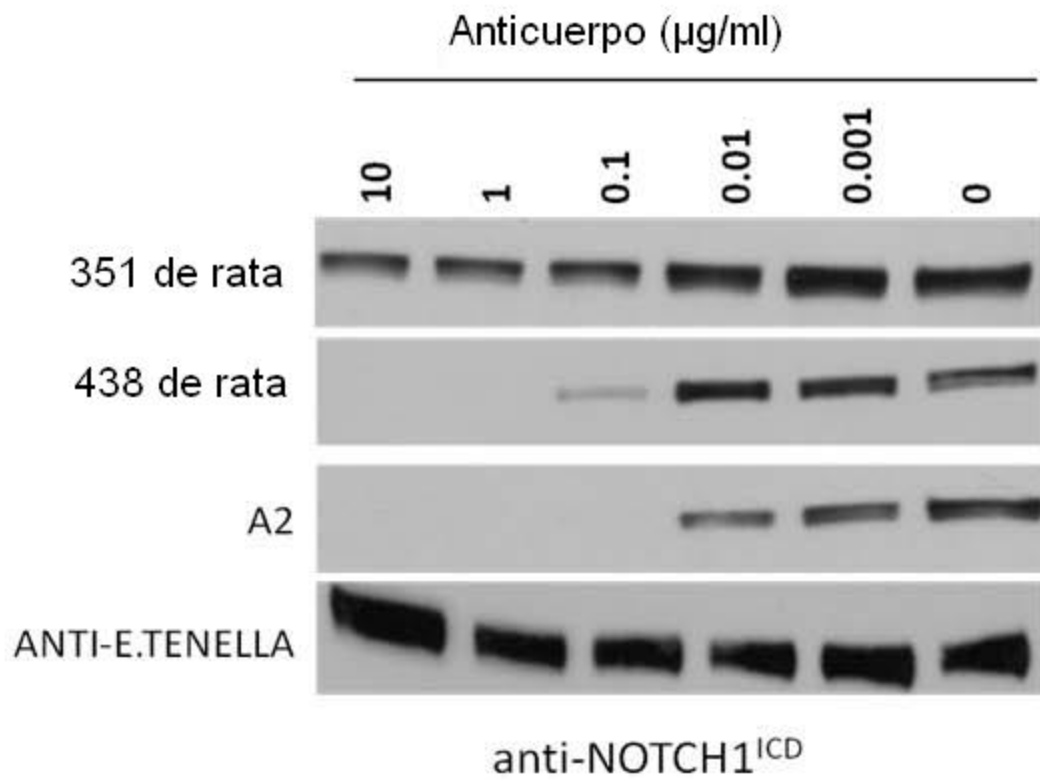


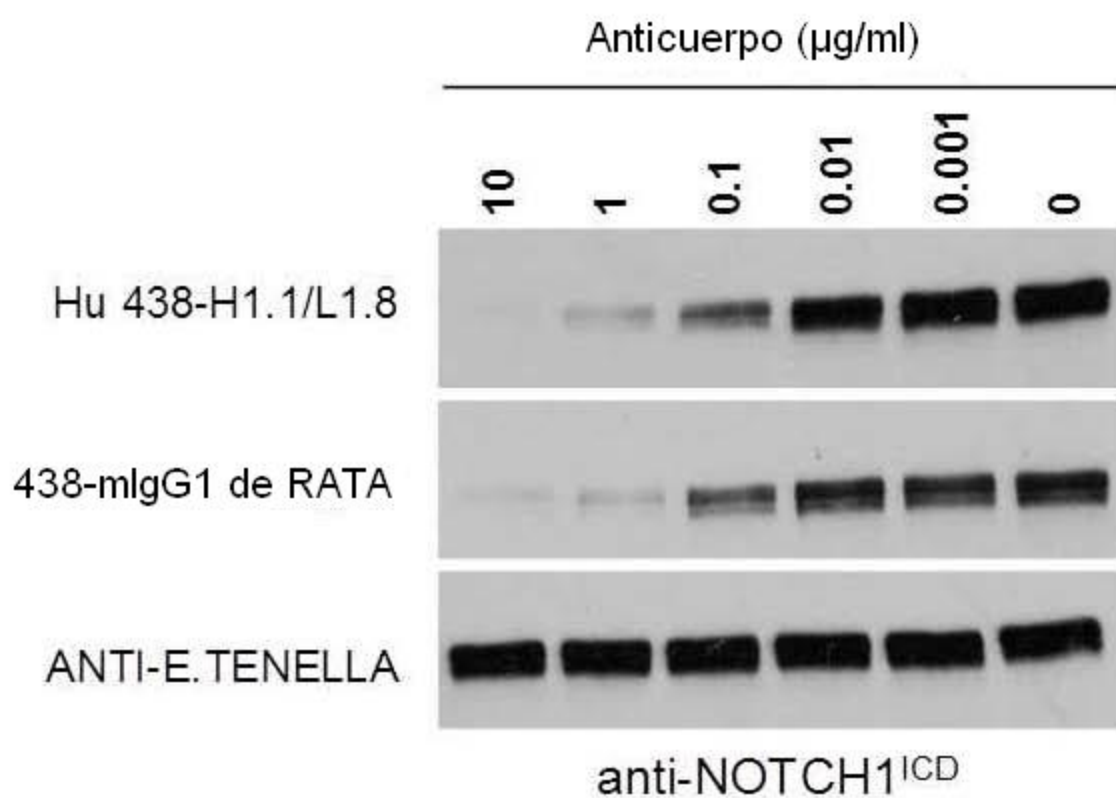
FIG. 17



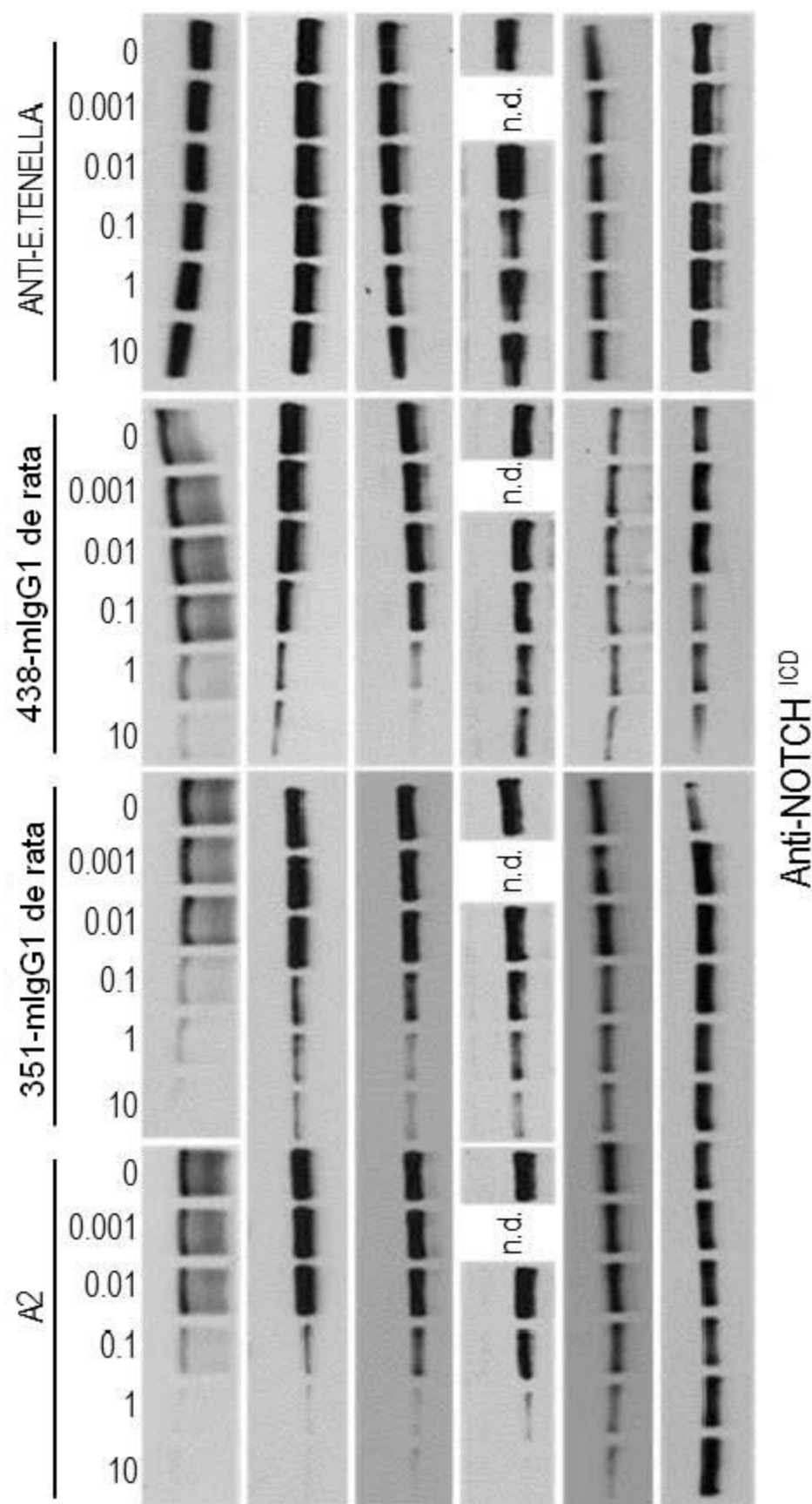
Imágenes confocales representativas de tinción con Isolectina B4-Alexa 488 en un modelo de angiogénesis retinal de ratón

FIG. 18

Análisis Western blot de extractos de proteínas generados de fibroblastos humanos CCD1076SK colocados en cavidades en ligando DLL4 humano recombinante

FIG. 19

Análisis Western blot de extractos de proteínas generados de células HPB-ALL

FIG. 20 Análisis Western blot de extractos de proteínas generados de células T-ALL

Análisis Western blot de extractos de proteínas generados de líneas de células T-ALL (n.d. = no determinado)

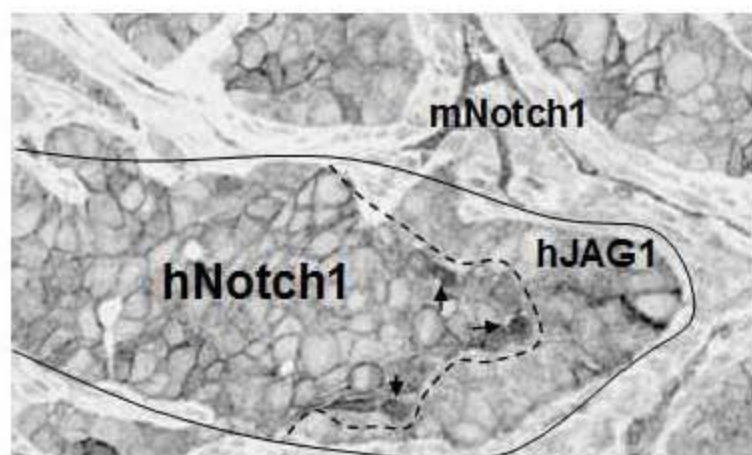
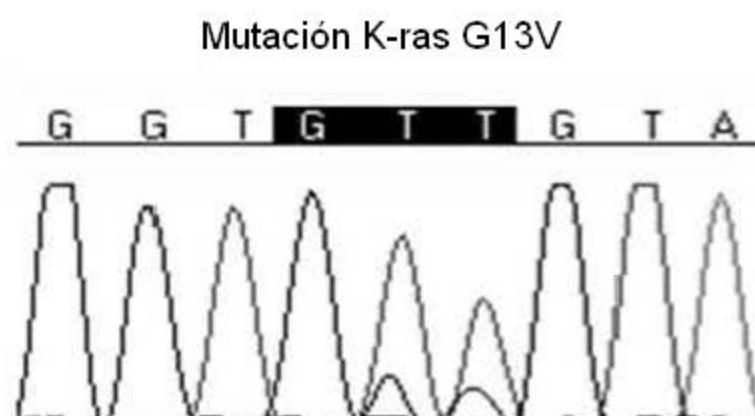
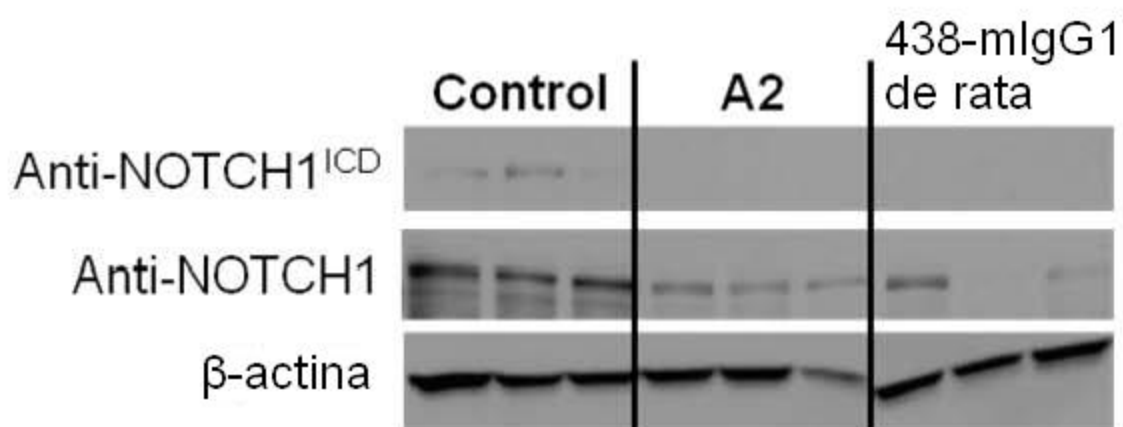
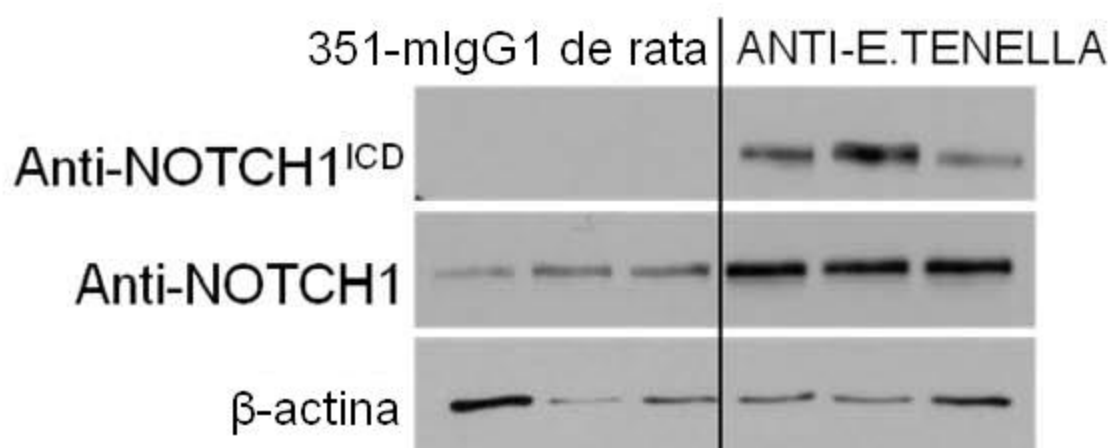
FIG. 21**FIG. 22**

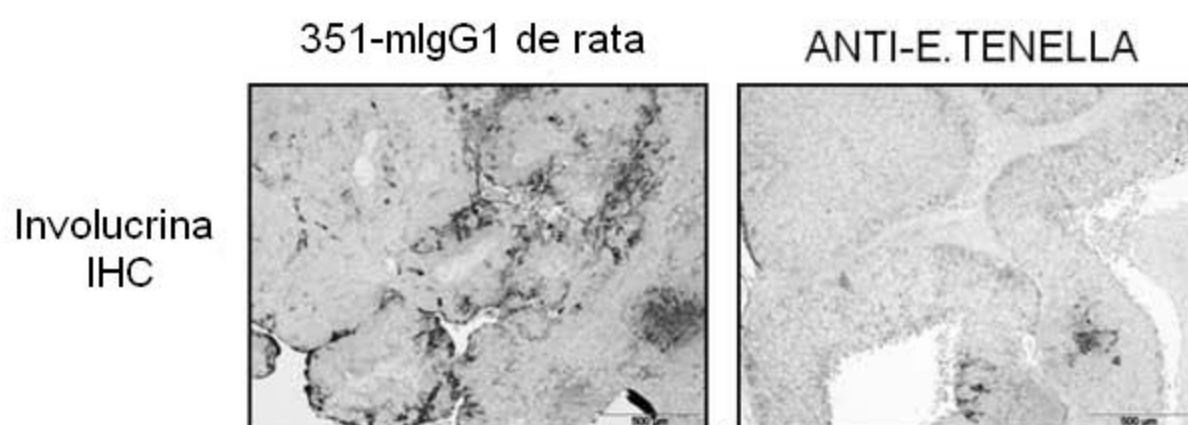
FIG. 23

Análisis Western blot de extractos de proteínas generados en xenoinjertos derivados de pacientes con NSCLC 37622A1

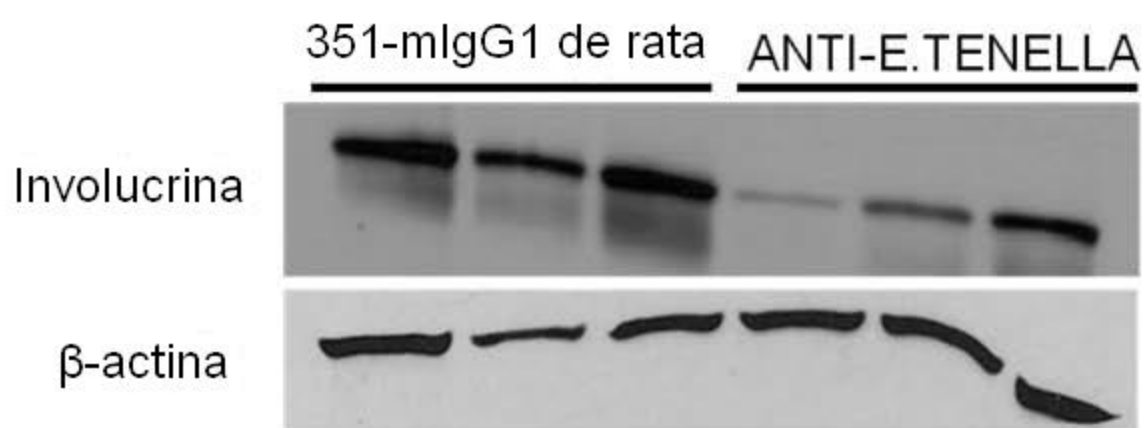
FIG. 24

Análisis Western blot de extractos de proteínas generados en xenoinjertos derivados de pacientes con NSCLC 87393A1

FIG. 25

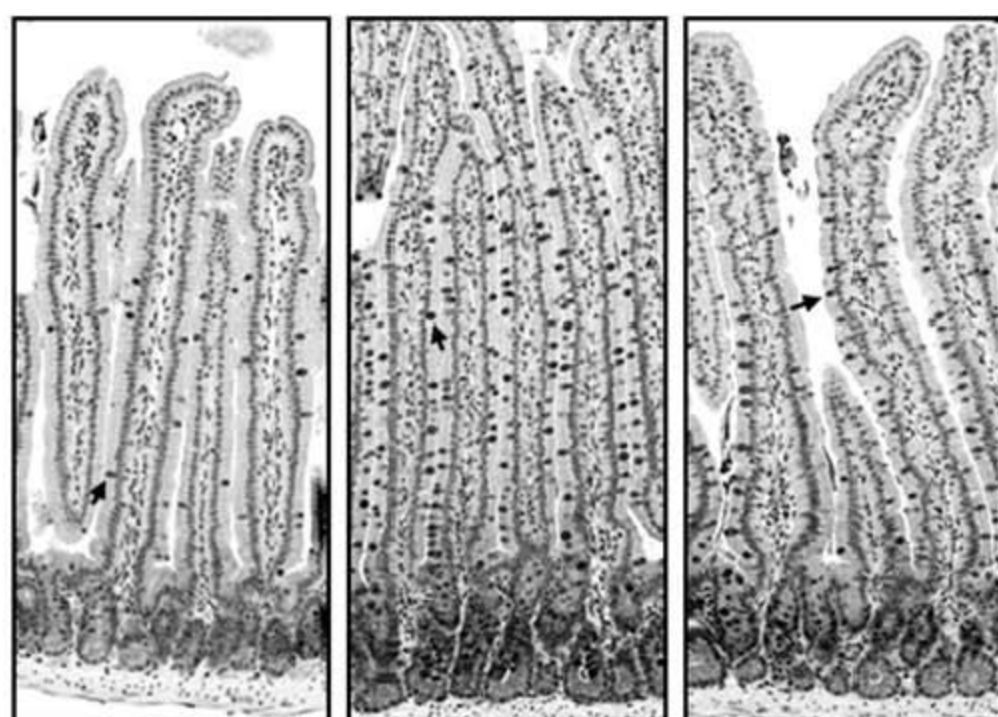


Detección inmunohistoquímica de la expresión de involucrina en xenoinjertos derivados de pacientes con NSCLC 87393A1

FIG. 26

Análisis Western blot de la expresión de involucrina en xenoinjertos derivados de pacientes con NSCLC 87393A1

FIG. 27



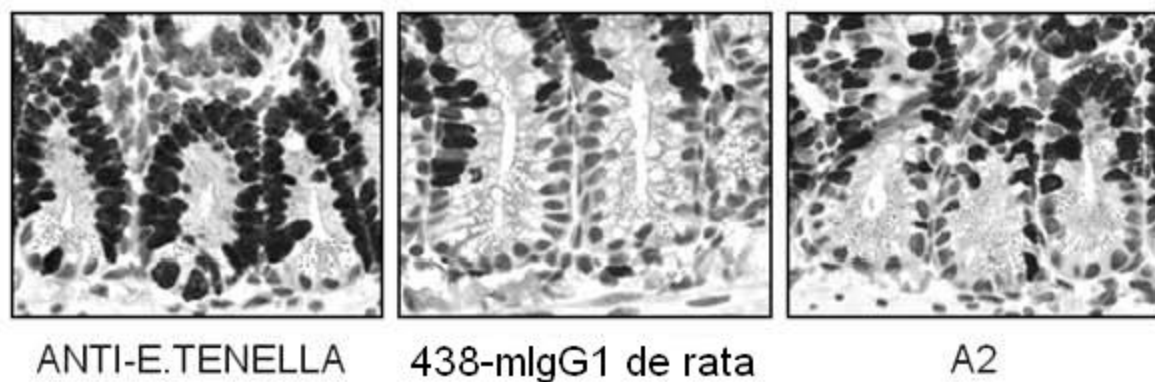
ANTI-
E.TENELLA

438-mIgG1
de rata

A2

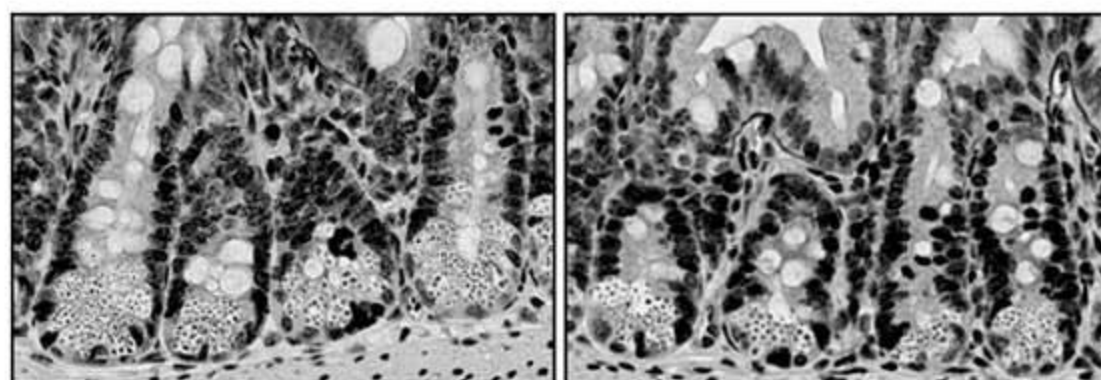
Identificación histoquímica de células caliciformes secretoras usando colorante azul de alcian en la sección del íleon de los intestinos de ratón del estudio de eficacia Calu-6

FIG. 28



Inmunohistoquímica anti-Ki67 en criptas intestinales de
ratón del estudio de eficacia Calu-6

FIG. 29



351-mIgG1 de rata

ANTI-E.TENELLA

Inmunohistoquímica anti-Ki67 en criptas intestinales de ratón del estudio de eficacia de xenoinjertos derivados de pacientes con NSCLC 87393A1

PC71751A.Seq.Listing.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth LLC
GELES, Kenneth G.
ZHOU, Bin-Bing Stephen
TCHISTIAKOVA, Lioudmila Gennadievna
GAO, Yijie
BARD, Joel

<120> ANTI-NOTCH1 ANTIBODIES

<130> PC71751A

<160> 152

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 1

Met	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	His	Pro
1				5					10					15	

Gly	Gly	Ala	Gly	Arg	Asp	Ile	Pro	Pro	Pro	Leu	Ile	Glu	Glu	Ala	Cys
			20					25					30		

Glu	Leu	Pro	Glu	Cys	Gln	Glu	Asp	Ala	Gly	Asn	Lys	Val	Cys	Ser	Leu
		35					40					45			

Gln	Cys	Asn	Asn	His	Ala	Cys	Gly	Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu
	50					55					60				

Asn	Phe	Asn	Asp	Pro	Trp	Lys	Asn	Cys	Thr	Gln	Ser	Leu	Gln	Cys	Trp
65					70					75					80

Lys	Tyr	Phe	Ser	Asp	Gly	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Cys	Asn	Ser	Ala	Gly
				85					90					95	

Cys	Leu	Phe	Asp	Gly	Phe	Asp	Cys	Gln	Arg	Ala	Glu	Gly	Gln	Cys	Asn
			100					105					110		

Pro	Leu	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Cys	Lys	Asp	His	Phe	Ser	Asp	Gly	His	Cys
		115					120					125			

Asp	Gln	Gly	Cys	Asn	Ser	Ala	Glu	Cys	Glu	Trp	Asp	Gly	Leu	Asp	Cys
	130					135					140				

PC71751A.Seq.Listing.txt

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val
145 150 155 160

Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
165 170 175

Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
180 185 190

Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu
195 200 205

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro
210 215 220

Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser
225 230 235 240

Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly
245 250 255

Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser
260 265 270

Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala
275 280 285

Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val
290 295 300

Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met
305 310 315 320

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
325 330 335

Ile Glu Trp His Glu Gly Gly Pro Pro His His His His His His
340 345 350

<210> 2
<211> 304
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys
1 5 10 15

PC71751A.Seq.Listing.txt

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu
20 25 30

Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
35 40 45

Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
50 55 60

Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
65 70 75 80

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn
85 90 95

Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
100 105 110

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
115 120 125

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val
130 135 140

Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
145 150 155 160

Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
165 170 175

Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu
180 185 190

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro
195 200 205

Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser
210 215 220

Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly
225 230 235 240

Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser
245 250 255

Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala
260 265 270

PC71751A.Seq.Listing.txt

Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val
275 280 285

Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met
290 295 300

<210> 3
<211> 1053
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 3
atgcctctcc tcctcttgct gctcctgctg ccaagcccct tacacgcggg tggggccggg 60
cgcgacatcc ccccgccgct gatcgaggag gcgtgcgagc tgcccagagt ccaggaggac 120
gcgggcaaca aggtctgcag cctgcagtgc aacaaccacg cgtgcggctg ggacggcggg 180
gactgctccc tcaacttcaa tgacccttg aagaactgca cgcagtctct gcagtgtctg 240
aagtacttca gtgacggcca ctgtgacagc cagtgcact cagccggctg cctcttcgac 300
ggctttgact gccagcgtgc ggaaggccag tgcaaccccc tgtacgacca gtactgcaag 360
gaccacttca gcgacgggca ctgcgaccag ggctgcaaca gcgcggagtg cgagtgggac 420
gggctggact gtgcggagca tgtacccgag aggttggcgg ccggcacgct ggtggtggtg 480
gtgctgatgc cgccggagca gctgcgcaac agctccttcc acttcctgcg ggagctcagc 540
cgctgtctgc acaccaacgt ggtcttcaag cgtgacgcac acggccagca gatgatcttc 600
ccctactacg gccgagagga ggagctgcgc aagcacccca tcaagcgtgc cgccgagggc 660
tgggccgcac ctgacgccct gctggggccag gtgaaggcct cgctgctccc tgggtggcagc 720
gaggggtggg gccggcggag ggagctggac cccatggagc tccgcggctc catcgtctac 780
ctggagattg acaaccggca gtgtgtgcag gcctcctcgc agtgcttcca gagtgccacc 840
gacgtggccg cattcctggg agcgtcgcgc tcgctgggca gcctcaacat cccctacaag 900
atcgaggccg tgcagagtga gaccgtggag ccgccccgc cggcgcagct gcacttcatg 960
ggagggggaa gcggaggcgg actgaacgac atcttcgagg ctcagaaaat cgaatggcac 1020
gaaggtggcc caccacatca tcatcatcat cac 1053

<210> 4
<211> 912
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ggtggggccg ggcgcgacat ccccccgcg ctgatcgagg aggcgtgcga gctgcccag 60

PC71751A.Seq.Listing.txt

tgccaggagg acgcgggcaa caaggtctgc agcctgcagt gcaacaacca cgcgtgcggc	120
tgggacggcg gtgactgctc cctcaacttc aatgaccctt ggaagaactg cacgcagtct	180
ctgcagtgtc ggaagtactt cagtgcggc cactgtgaca gccagtgcaa ctcagccggc	240
tgcctcttcg acggctttga ctgccagcgt gcggaaggcc agtgcaaccc cctgtacgac	300
cagtactgca aggaccactt cagcgacggg cactgcgacc agggctgcaa cagcgcgag	360
tgcgagtggg acgggctgga ctgtgcggag catgtaccg agaggctggc ggccggcacg	420
ctggtggtgg tgggtgtgat gccgccggag cagctgcgca acagctcctt ccacttcctg	480
cgggagctca gccgcgtgct gcacaccaac gtggtcttca agcgtgacgc acacggccag	540
cagatgatct tcccctacta cggccgcgag gaggagctgc gcaagcacc catcaagcgt	600
gccgccgagg gctgggccc acctgacgcc ctgctgggccc aggtgaaggc ctcgctgctc	660
cctggtggca gcgaggggtg gcggcggcgg agggagctgg accccatgga cgtccgcggc	720
tccatcgtct acctggagat tgacaaccgg cagtgtgtgc aggcctcctc gcagtgcctc	780
cagagtgcc cgcacgtggc cgcattcctg ggagcgctcg ctcgctggg cagcctcaac	840
atcccctaca agatcgaggc cgtgcagagt gagaccgtgg agccgcccc gccggcgcag	900
ctgcacttca tg	912

<210> 5
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide sequence
 <400> 5

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

PC71751A.Seq.Listing.txt

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly Gln Cys Asn
 100 105 110
 Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
 115 120 125
 Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
 130 135 140
 Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Leu Val
 145 150 155 160
 Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe His Phe Leu
 165 170 175
 Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
 180 185 190
 Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His Glu Glu Glu
 195 200 205
 Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp Ala Thr Ser
 210 215 220
 Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg Arg Glu Leu Asp
 225 230 235 240
 Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg
 245 250 255
 Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val
 260 265 270
 Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro
 275 280 285
 Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro
 290 295 300
 Ser Gln Leu His Leu Met Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp
 305 310 315 320
 Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Gly Gly Pro Pro His
 325 330 335
 His His His His His

340

<210> 6
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Gln Ile Glu Glu Ala Cys
 1 5 10 15

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Asn Leu
 20 25 30

Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
 35 40 45

Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
 50 55 60

Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
 65 70 75 80

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly Gln Cys Asn
 85 90 95

Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
 100 105 110

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
 115 120 125

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Leu Val
 130 135 140

Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe His Phe Leu
 145 150 155 160

Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
 165 170 175

Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His Glu Glu Glu
 180 185 190

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp Ala Thr Ser
 195 200 205

Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg Arg Glu Leu Asp
 Page 7

210

215

Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg
225 230 235 240

Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val
245 250 255

Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro
260 265 270

Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro
275 280 285

Ser Gln Leu His Leu Met
290

<210> 7
<211> 1023
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 7
atgcctctcc tcctcttgct gctcctgctg ccaagcccct tacacgcggg tggcgctggg 60
cgcgacattc cccaccgca gattgaggag gcctgtgagc tgcctgagtg ccagggtggat 120
gcaggcaata aggtctgcaa cctgcagtgt aataatcacg catgtggctg ggatggtggc 180
gactgctccc tcaacttcaa tgaccctgg aagaactgca cgcagtctct acagtgctgg 240
aagtatttta gcgacggcca ctgtgacagc cagtgcaact cggccggctg cctctttgat 300
ggcttcgact gccagctcac cgagggacag tgcaaccccc tgtatgacca gtactgcaag 360
gaccacttca gtgatggcca ctgcgaccag ggctgtaaca gtgccgaatg tgagtgggat 420
ggcctagact gtgctgagca tgtaccgag cggctggcag ccggcaccct ggtgctggtg 480
gtgctgcttc caccgacca gctacggaac aactccttcc actttctgcg ggagctcagc 540
cacgtgctgc acaccaacgt ggtcttcaag cgtgatgcgc aaggccagca gatgatcttc 600
ccgtactatg gccacgagga agagctgcgc aagcacccaa tcaagcgctc tacagtgggt 660
tgggccacct cttcactgct tcctggtacc agtggtgggc gccagcgag ggagctggac 720
cccatggaca tccgtggctc cattgtctac ctggagatcg acaaccggca atgtgtgcag 780
tcatcctcgc agtgcttcca gagtgccacc gatgtggctg ccttcctagg tgctcttgcg 840
tcacttggca gcctcaatat tccttacaag attgaggccg tgaagagtga gccggtggag 900
cctccgctgc cctcgcagct gcacctcatg ggagggggaa gcggaggcgg actgaacgac 960

PC71751A.Seq.Listing.txt

atcttcgagg ctcagaaaat cgaatggcac gaaggtggcc caccacatca tcatcatcat 1020
cac 1023

<210> 8
<211> 882
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 8
gggtggcgctg ggcgcgacat tccccaccg cagattgagg aggcctgtga gctgcctgag 60
tgccaggtgg atgcaggcaa taaggtctgc aacctgcagt gtaataatca cgcatgtggc 120
tgggatggtg gcgactgctc cctcaacttc aatgaccctt ggaagaactg cacgcagtct 180
ctacagtgtc ggaagtatct tagcgacggc cactgtgaca gccagtgcaa ctcggccggc 240
tgctctcttg atggcttcga ctgccagctc accgagggac agtgcaaccc cctgtatgac 300
cagtactgca aggaccactt cagtgtatggc cactgcgacc agggctgtaa cagtgccgaa 360
tgtgagtggg atggcctaga ctgtgctgag catgtacccg agcggctggc agccggcacc 420
ctggtgctgg tgggtgctgt tccaccgcac cagctacgga acaactcctt ccactttctg 480
cgggagctca gccacgtgct gcacaccaac gtggtcttca agcgtgatgc gcaaggccag 540
cagatgatct tcccgtacta tggccacgag gaagagctgc gcaagcacc aatcaagcgc 600
tctacagtgg gttggggcac ctcttactg cttcctggta ccagtgggtg gcgccagcgc 660
agggagctgg accccatgga catccgtggc tccattgtct acctggagat cgacaaccgg 720
caatgtgtgc agtcactctc gcagtgttc cagagtgcc aagatgtggc tgccttccta 780
gggtgctctt cgtcacttgg cagcctcaat attccttaca agattgaggc cgtgaagagt 840
gagccggtgg agcctccgct gccctcgag ctgcacctca tg 882

<210> 9
<211> 564
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val
35 40 45

PC71751A.Seq.Listing.txt

Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp
 50 55 60
 Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn
 85 90 95
 Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly
 100 105 110
 Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp
 115 120 125
 Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly
 130 135 140
 Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu
 145 150 155 160
 Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe
 165 170 175
 His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe
 180 185 190
 Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg
 195 200 205
 Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp
 210 215 220
 Ala Ala Pro Glu Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp
 245 250 255
 Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val
 260 265 270
 Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe
 275 280 285
 Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile

PC71751A.Seq.Listing.txt
300

290

295

Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu
305 310 315 320

His Phe Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Pro Lys Ser
325 330 335

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
355 360 365

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
370 375 380

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
385 390 395 400

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
405 410 415

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
420 425 430

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
435 440 445

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
450 455 460

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
465 470 475 480

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
485 490 495

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
500 505 510

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
515 520 525

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
530 535 540

PC71751A.Seg.Listing.txt

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
545 550 555 560

Ser Pro Gly Lys

<210> 10
<211> 304
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 10

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys
1 5 10 15

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu
20 25 30

Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
35 40 45

Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
50 55 60

Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
65 70 75 80

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn
85 90 95

Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
100 105 110

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
115 120 125

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val
130 135 140

Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
145 150 155 160

Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
165 170 175

Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu
180 185 190

PC71751A.Seq.Listing.txt

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro
195 200 205

Glu Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly
225 230 235 240

Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser
245 250 255

Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala
260 265 270

Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val
275 280 285

Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met
290 295 300

<210> 11
<211> 1692
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 11
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccggt 60
ggggccgggc ggcacatccc cccgccgctg atcgaggagg cgtgcgagct gcccgagtgc 120
caggaggacg cgggcaacaa ggtctgcagc ctgcagtgc acaaccacgc gtgcggctgg 180
gacggcggtg actgctccct caacttcaat gacccttgga agaactgcac gcagtctctg 240
cagtgtgga agtacttcag tgacggccac tgtgacagcc agtgcaactc agccggctgc 300
ctcttcgacg gctttgactg ccagcgtgcg gaaggccagt gcaaccccct gtacgaccag 360
tactgcaagg accacttcag cgacgggcac tgcgaccagg gctgcaacag cgcggagtgc 420
gagtgggacg ggctggactg tgcggagcat gtacccgaga ggctggcggc cggcacgctg 480
gtggtggtgg tgctgatgcc gccggagcag ctgcgcaaca gtcctttcca cttcctgcgg 540
gagctcagcc gcgtgctgca caccaacgtg gtcttcaagc gtgacgcaca cggccagcag 600
atgatcttcc cctactacgg ccgcgaggag gagctgcgca agcaccat caagcgtgcc 660
gccgagggct gggccgcacc tgaagccctg ctgggccagg tgaaggcctc gctgctccct 720
ggtggcggtg gaggtgggcg gcggcggagg gagctggacc ccatggacgt ccgcggctcc 780

PC71751A.Seq.Listing.txt

```

atcgtctacc tggagattga caaccggcag tgtgtgcagg ctcctcgcga gtgcttccag      840
agtgccaccg acgtggccgc attcctggga gcgctcgcct cgctgggcag cctcaacatc      900
ccctacaaga tcgaggccgt gcagagtga accgtggagc cgcccccgcc ggcgcagctg      960
cacttcatgg gagggggcg atccggcgga ggcggagagc ccaaattctt tgacaaaact     1020
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcttggggg gaccgtcagt cttcctcttc     1080
ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgata tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg     1140
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag     1200
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc     1260
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggctc     1320
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc     1380
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggctc     1440
agcctgacct gcctggtcaa aggttcttat ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc     1500
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc     1560
ttcttctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc     1620
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg     1680
tccccgggta aa                                           1692

```

```

<210> 12
<211> 912
<212> DNA
<213> Macaca fascicularis

```

```

<400> 12
gggtggggccg ggcgcgacat cccccgccg ctgatcgagg aggcgtgcga gctgcccag      60
tgccaggagg acgcgggcaa caaggtctgc agcctgcagt gcaacaacca cgcgtgcggc     120
tgggacggcg gtgactgctc cctcaacttc aatgaccctt ggaagaactg cacgcagtct     180
ctgcagtgtt ggaagtactt cagtgcggc cactgtgaca gccagtgcaa ctcagccggc     240
tgcctcttcg acggctttga ctgccagcgt gcggaaggcc agtgcaaccc cctgtacgac     300
cagtactgca aggaccactt cagcgacggg cactgcgacc agggctgcaa cagcgcgag     360
tgcgagtggg acgggctgga ctgtgcggag catgtaccgg agaggctggc ggccggcacg     420
ctggtggtgg tgggtgtgat gccgccggag cagctgcgca acagctcctt ccacttctctg     480
cgggagctca gccgcgtgct gcacaccaac gtggtcttca agcgtgacgc acacggccag     540
cagatgatct tcccctacta cggccgcgag gaggagctgc gcaagcacc catcaagcgt     600
gccgccgagg gctgggcccgc acctgaagcc ctgctggggc aggtgaaggc ctcgctgctc     660
cctggtggcg gtggaggtgg gcggcggcgg agggagctgg accccatgga cgtccgcggc     720

```

PC71751A.Seq.Listing.txt

tccatcgtct acctggagat tgacaaccgg cagtgtgtgc aggcctcctc gcagtgcttc	780
cagagtgccca ccgacgtggc cgcattcctg ggagcgctcg cctcgctggg cagcctcaac	840
atcccctaca agatcgaggc cgtgcagagt gagaccgtgg agccgcccc gccggcgag	900
ctgcatttca tg	912

<210> 13
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 13

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe	
20 25 30	

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	

Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val	
50 55 60	

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr	
65 70 75 80	

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ser Thr Tyr Tyr Cys	
85 90 95	

Ala Lys Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala	
100 105 110	

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 14
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 14

gcggtacagt tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaaggct cttgaaactc	60
tcctgtacag cctctggatt cactttcagt agctttgcaa tggcctgggt ccgccaggct	120

PC71751A.Seq.Listing.txt

ccaacgaagg ggctggagtg ggtcgcatcc attagttatg gtggtgctga cacttactat	180
cgagactccg tgaagggccg attcactatc tccagagata atgcaaaaag cagcctatat	240
ttgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acgtccactt attactgtgc aaaagacctt	300
ccatactacg gatatacccc ctttgttatg gatgcctggg gtcagggaac ttcagtcact	360
gtctcctca	369

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 15

Ser	Phe	Ala	Met	Ala
1			5	

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 16

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Ala	Met	Ala
1				5				10	

<210> 17
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 17	
tccttcgcca tggcc	15

<210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 18	
ggattcacct ttagttcctt cgccatggcc	30

PC71751A.Seq.Listing.txt

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 19

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

Gly

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 20

Ser Tyr Gly Gly Ala Asp
 1 5

<210> 21
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 21
 tccatctcct atggaggcgc tgacacctac taccgggact ccgtgaaggg c 51

<210> 22
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 22
 cctatggagg cgctgac 17

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 23

Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 24

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic nucleotide sequence

<400> 24

gatctgccct actacggcta cacccttc gtgatggacg cc

42

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide sequence

<400> 25

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

Glu Thr Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 26

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

PC71751A.Seq.Listing.txt

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 26
 gacatcatgc tgactcagtc tccacctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gaccatcagt 60
 ctctcctgca gggccagtca gagaattaac actgacttac attggtatca gcaaaaacca 120
 aatgagtctc caagggttct catcaaattt gcttcccaga ccatctctgg agtcccctcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcactctca atattaacag agtagagcct 240
 gaagatTTTT cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccatacac gtttggcgct 300
 gggaccaagc tggaactgaa a 321

<210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 27
 Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp Leu His
 1 5 10

<210> 28
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 28
 cgggcctccc agcggatcaa caccgacctg cac 33

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 29
 Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser
 1 5

<210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 30

ttcgccagcc agaccatctc c

21

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 31

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 32

cagcagtcca actcctggcc ctacacc

27

<210> 33

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 33

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

Ser Leu Lys Val Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
Page 20

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 34
gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggtc cctgaaagtc 60
tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggactg ggttgcattt attagtagga gtggcagtta catccgctat 180
gtagacacag tgaagggccg attcaccgct tccagagaca ttgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaataa ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg 300
caattcgggg actactttga gtactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcctca 357

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 35

His Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 37
<211> 15

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 37
 cactatggaa tgaac 15

<210> 38
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 38
 ggattcactt tcagtcacta tggaatgaac 30

<210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide sequence
 <400> 39
 Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide sequence
 <400> 40
 Ser Arg Ser Gly Ser Tyr
 1 5

<210> 41
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 41

tctattagta ggagtggcag ttacatccgc tatgtagaca cagtgaaggg c 51

<210> 42
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 42
 agtaggagtg gcagttac 18

<210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 43

Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr
 1 5 10

<210> 44
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 44
 gagggacaat tcggggacta ctttgagtac 30

<210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 45

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

Glu Arg Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Ile Leu Ile
 35 40 45

PC71751A.Seq.Listing.txt

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu His Ile Asn Thr Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 46
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 46
gacatcatgc tgactcagtc tccagctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gagaatcagt 60
ctctcctgca gggccagtc gaaaattagc actaacttac attggtatca gcaaaagcca 120
aatgagtctc caaggattct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcactctcc atattaacac agtagagcct 240
gaagatTTTT cagtttatta ctgtcaacag actaatagtt ggccgctcac gttcggttct 300
gggaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 47

Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn Leu His
1 5 10

<210> 48
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 48
agggccagtc agaaaattag cactaactta cat 33

PC71751A.Seq.Listing.txt

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 49

Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 50

tatgcttccc agaccatctc t

21

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 51

Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 52
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 52

caacagacta atagttggcc gctcacg

27

<210> 53
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 53

PC71751A.Seq.Listing.txt

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Arg Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 54	
gaggtgcagc tagtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggct cctgaaactc	60
tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggag tgaactggat tcgccaggct	120
ccagggaagg ggctggaatg gattgcatct attagtagaa gtagcagtta catctactat	180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgttc	240
ctgcaattga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg	300
caattcgggg actactttga atactggggc cgaggagtca tggtcacagt ctcctca	357

<210> 55
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 55

PC71751A.Seq.Listing.txt

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

<210> 56
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 56
 gacatcatatc tgactcagtc tccagctgcc ctgtctgtaa ctccaggaga gagcatcagt 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtattaac actaacttgc attggtatca gcaaaaacca 120
 aatgagtctc caagggttct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc 180
 aggttcagtg gcagtgatc agggacagat ttactctca atattaacag agtagagcct 240
 gaagattttt cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccgctcac gttcggttct 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 57
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 57

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

PC71751A.Seq.Listing.txt

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Thr Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 58
gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggct cctgaaactc 60
tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gattacatct attactagta gtagcagtta catctactat 180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg 300
caattcgggg actactttga ttactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcctca 357

<210> 59
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 59

Asp Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
Page 28

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

<210> 60
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 60
gacatcatgc tgactcagtc tccagctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gagcatcagt 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattaac actaacttac attggtatca gcaaaaacca 120
aatgagtctc caagggttct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttactctca atattaacag agtagagcct 240
gaagatTTTT cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccgctcac gttcggttct 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 61
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 61

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

PC71751A.Seq.Listing.txt

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Thr Ser Ile Thr Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 62
gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggct cctgaaactc 60
tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg gattacatct attactagta gtagcagtta catctactat 180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaataa ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg 300
caattcgggg actactttga ttactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcctca 357

<210> 63
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 63

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

PC71751A.Seq.Listing.txt

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 64
gacatcatgc tgactcagtc tccagctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gagcatcagt 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattaac actaacttac attggtatca gcaaaaacca 120
aatgagtctc caagggttct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcactctca atattaacag agtagagcct 240
gaagatTTTT cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccgctcac gttcggttct 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 65
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 65

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

PC71751A.Seq.Listing.txt

His Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Trp Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Leu Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Asp Phe Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 66
caggtgcagg tgaaggagtc aggacctggt ctggtgcagc cctcacagac tttgtctctc 60
acctgcactg tctctgggtt ctactaacc agctatcatg taagctgggt tcgccagcct 120
ccaggaaaag gtctggagtg gatgggagca atatggactg gtggaagcac agcatataat 180
tcactttctca aatcccgact gagcatcagc agggacatct ccaagagcca agttttctta 240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgaagacaca gccacttact actgtgccag agccgatttc 300
tatgttatgg atgcctgggg tcaaggagct tcagtcactg tctcctca 348

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 67

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

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Asp
Page 32

20

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Gly Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 68
<211> 320
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic nucleotide sequence

<400> 68
acatcatgct gactcagtct ccagttaccc tgtctgtgtc tccaggagag agcatcagtc 60
tctcctgcag ggccagtcag agtattagca ctgacttgca ttggtatcag caaaaaccaa 120
atgagtctcc aagggttctc atcaaatatg gttcccagac catctctgga atcccctcca 180
ggttcagtgg cagtggatca gggacagatt tcactctcaa tattaacaga gtagagcctg 240
aagatttttc agtttattac tgtcagcaga gtaatagctg gccatggaca ttcggtggag 300
gcaccaagct ggaattgaaa 320

<210> 69
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide sequence

<400> 69

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

PC71751A.Seq.Listing.txt

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 369
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 70
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgcca tggcctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctcctatg gaggcgctga cacctactac 180
cgggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctg 300
ccctactacg gctacacccc cttcgtgatg gacgcctggg gccagggaac cctgggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 71
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
Page 34

20

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 72
<211> 369
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 72
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgcca tggcctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctcctatg gaggcgctga cacctactac 180
cgggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaggatctg 300
ccctactacg gctacacccc cttcgtgatg gacgcctggg gccaggggaac cctgggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 73

Ser Phe Ala Met Ala
1 5

PC71751A.Seq.Listing.txt

<210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence
 <400> 74

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met Ala
 1 5 10

<210> 75
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 75
 tccttcgcca tggcc 15

<210> 76
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 76
 ggattcacct ttagttcctt cgccatggcc 30

<210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 77
 Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 78
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 78

Ser Tyr Gly Gly Ala Asp
 1 5

<210> 79

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 79

tccatctcct atggaggcgc tgacacctac taccgggact ccgtgaaggg c

51

<210> 80

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 80

cctatggagg cgctgac

17

<210> 81

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 81

Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
 1 5 10

<210> 82

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 82

gatctgccct actacggcta cacccttc gtgatggacg cc

42

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

PC71751A.Seq.Listing.txt

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 83

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 84

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 84

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag	300
gggaccaagc tggagatcaa a	321

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

PC71751A.Seq.Listing.txt

<400> 85

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

<210> 86

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic nucleotide sequence

<400> 86

gacatccagc	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcctccca	gcggatcaac	accgacctgc	actggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaaggtgct	gatcaagttc	gccagccaga	ccatctccgg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcagcag	tccaactcct	ggccctacac	ctttggccag	300
gggaccaagc	tggagatcaa	a				321

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide sequence

<400> 87

PC71751A.Seq.Listing.txt

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 88
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 88
gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 89
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 89

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

PC71751A.Seq.Listing.txt

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 90
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 90
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtgct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

PC71751A.Seq.Listing.txt

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 92
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 92
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 93

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
Page 42

35

40

45

Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 94
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 94
 gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagggtgct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 95
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 95

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

PC71751A.Seq.Listing.txt

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 96
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 96
gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 97

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

PC71751A.Seq.Listing.txt

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 98
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 98
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp Leu His
1 5 10

<210> 100
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 100
cgggcctccc agcggatcaa caccgacctg cac 33

<210> 101
<211> 7

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 101

Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser
 1 5

<210> 102
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 102
 ttgccagcc agaccatctc c

21

<210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 103

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 104
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 104
 cagcagtcca actcctggcc ctacacc

27

<210> 105
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 105

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

PC71751A.Seq.Listing.txt

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 106
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 106
gacatcatgc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 107
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 107

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

PC71751A.Seq.Listing.txt

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 108
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 108
gacatcatgc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 109
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 109

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Val Leu Ile
Page 48

35

40

45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 110

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 110

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 111

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 111

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

PC71751A.Seq.Listing.txt

Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

PC71751A.Seq.Listing.txt

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 112
<211> 1359
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 112
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgcca tggcctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctcctatg gaggcgctga cacctactac 180
cgggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaggatctg 300
ccctactacg gctacacccc cttcgtgatg gacgcctggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctcag cgctcgaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420

PC71751A.Seq.Listing.txt

```

acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg      480
acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta      540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc      600
acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa      660
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaagcc      720
gctggggcac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc      780
cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag      840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag      900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg      960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa     1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc     1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc     1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg     1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag     1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac     1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaa     1359

```

```

<210> 113
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

```

```

<400> 113

```

```

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

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
          20          25          30

```

```

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
          35          40          45

```

```

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

```


PC71751A.Seq.Listing.txt

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 114
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 114
gacatcatgc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

PC71751A.Seq.Listing.txt

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt	642

<210> 115
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 115

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr	
20 25 30	
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ala Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val	
50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 116
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 116

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt cactacggca tgaactgggt ccgccaggct	120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctccagat ccggctccta catcagatac	180

gtggacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggc 300
 cagttcggcg actacttcga gtactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 117
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 117

His Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 118
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 118

Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Gly Met Asn
 1 5 10

<210> 119
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 119
 cactatggaa tgaac 15

<210> 120
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 120
 ggattcactt tcagtcacta tggaatgaac 30

<210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

PC71751A.Seq.Listing.txt

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 121

Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 122

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 122

Ser Arg Ser Gly Ser Tyr
1 5

<210> 123

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 123

tctattagta ggagtggcag ttacatccgc tatgtagaca cagtgaaggg c 51

<210> 124

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 124

agtaggagtg gcagttac 18

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 125

Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr

1

5

<210> 126
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic nucleotide sequence

<400> 126
gagggacaat tcggggacta ctttgagtac

30

<210> 127
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide sequence

<400> 127

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 128
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic nucleotide sequence

<400> 128
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc

60

PC71751A.Seq.Listing.txt

```
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

<210> 129
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 129

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 130
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 130

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120

PC71751A.Seq.Listing.txt

gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 131
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 131

Arg	Ala	Ser	Gln	Lys	Ile	Ser	Thr	Asn	Leu	His
1				5					10	

<210> 132
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 132	
agggccagtc agaaaattag cactaactta cat	33

<210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 133

Tyr	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser
1				5		

<210> 134
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 134	
tatgcttccc agaccatctc t	21

<210> 135
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 135

Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu Thr Thr
 1 5 10

<210> 136
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 136
 caacagacta atagttggcc gctcacg

27

<210> 137
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 137

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 138

PC71751A.Seq.Listing.txt

<211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 138
 gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 139
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 139

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 140
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

PC71751A.Seq.Listing.txt

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 140
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagatcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 141
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 141

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 142
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

PC71751A.Seq.Listing.txt

```
<400> 142
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa a                                              321
```

```
<210> 143
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

```
<220>
<223> Synthetic peptide sequence
```

```
<400> 143
```

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
20          25          30
```

```
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
35          40          45
```

```
Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
```

```
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
85          90          95
```

```
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105
```

```
<210> 144
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

```
<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence
```

```
<400> 144
gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
```

PC71751A.Seq.Listing.txt

```
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagatcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

<210> 145
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 145

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 146
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 146

```
gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120
```

PC71751A.Seq.Listing.txt

gggaaagccc ctaagctcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 147
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide sequence

<400> 147

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn	
20 25 30	

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile	
35 40 45	

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu	
85 90 95	

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 148
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 148

gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct	240

PC71751A.Seq.Listing.txt

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 149
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 149

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

PC71751A.Seq.Listing.txt

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

PC71751A.Seq.Listing.txt

Lys

```
<210> 150
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 150
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt cactacggca tgaactgggt ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctccagat ccggctccta catcagatac      180
gtggacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggc      300
cagttcggcg actacttcga gtactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctca      357
```

```
<210> 151
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide sequence

<400> 151
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
20          25          30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
35          40          45
Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
85          90          95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
```


100

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 152
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 152
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

PC71751A-Spanish-Seq Listing
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wyeth LLC
GELES, Kenneth G.
ZHOU, Bin-Bing Stephen
TCHISTIAKOVA, Lioudmila Gennadievna
GAO, Yijie
BARD, Joel

<120> ANTICUERPOS ANTI-NOTCH1

<130> PC71751A

<160> 152

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 1

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro
1 5 10 15

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys
20 25 30

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu
35 40 45

Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
50 55 60

Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
65 70 75 80

Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
85 90 95

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn
100 105 110

Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
115 120 125

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
130 135 140

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val
145 150 155 160

Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
165 170 175

Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
180 185 190

Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu
195 200 205

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro
210 215 220

Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser
225 230 235 240

Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly
245 250 255

Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser
260 265 270

Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala
275 280 285

Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val
290 295 300

Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met
305 310 315 320

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
325 330 335

Ile Glu Trp His Glu Gly Gly Pro Pro His His His His His His
340 345 350

<210> 2
<211> 304
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys
1 5 10 15

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu
 20 25 30
 Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
 35 40 45
 Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
 50 55 60
 Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
 65 70 75 80
 Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn
 85 90 95
 Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
 100 105 110
 Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
 115 120 125
 Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val
 130 135 140
 Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
 165 170 175
 Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu
 180 185 190
 Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro
 195 200 205
 Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser
 210 215 220
 Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly
 225 230 235 240
 Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser
 245 250 255
 Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala
 260 265 270

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val
275 280 285

Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met
290 295 300

<210> 3
<211> 1053
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 3
atgcctctcc tcctcttgct gtcctgctg ccaagcccct tacacgcggg tggggccggg 60
cgcgacatcc ccccgccgct gatcgaggag gcgtgcgagc tgcccgagtg ccaggaggac 120
gcgggcaaca aggtctgcag cctgcagtgc aacaaccacg cgtgcggctg ggacggcggg 180
gactgctccc tcaacttcaa tgacccttg aagaactgca cgagctctct gcagtgtctg 240
aagtacttca gtgacggcca ctgtgacagc cagtgcact cagccggctg cctcttcgac 300
ggctttgact gccagcgtgc ggaaggccag tgcaaccccc tgtacgacca gtactgcaag 360
gaccacttca gcgacgggca ctgcgaccag ggctgcaaca gcgcggagtg cgagtgggac 420
gggctggact gtgcggagca tgtacccgag aggtggcg cgggcacgct ggtggtggtg 480
gtgctgatgc cgccggagca gctgcgcaac agctccttcc acttcctgcg ggagctcagc 540
cgcgctgctgc acaccaacgt ggtcttcaag cgtgacgcac acggccagca gatgatcttc 600
ccctactacg gccgcgagga ggagctgctc aagcacccca tcaagcgtgc cgccgagggc 660
tgggccgcac ctgacgccct gctgggcccag gtgaaggcct cgctgctccc tgggtggcagc 720
gaggggtggg gcgggaggag ggagctggac cccatggagc tccgcggctc catcgtctac 780
ctggagattg acaaccggca gtgtgtgcag gcctcctcgc agtgcttcca gaggccacc 840
gacgtggccg cattcctggg agcgtcgc tcgctgggca gcctcaacat cccctacaag 900
atcgaggccg tgcagagtga gaccgtggag ccgccccgc cggcgcagct gcacttcatg 960
ggaggggggaa gcggaggcgg actgaacgac atcttcgagg ctcaaaaaat cgaatggcac 1020
gaaggtggcc caccacatca tcatcatcat cac 1053

<210> 4
<211> 912
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4
gggtggggccg ggcgcgacat ccccccgccg ctgatcgagg aggcgtgcga gctgcccag 60

PC71751A-Spanish-Seq Listing

tgccaggagg acgcgggcaa caaggtctgc agcctgcagt gcaacaacca cgcgtgcggc	120
tgggacggcg gtgactgctc cctcaacttc aatgaccctt ggaagaactg cacgcagtct	180
ctgcagtgtc ggaagtactt cagtgcggc cactgtgaca gccagtgcaa ctcagccggc	240
tgcctcttcg acggccttga ctgccagcgt gcggaaggcc agtgcaaccc cctgtacgac	300
cagtactgca aggaccactt cagcgacggg cactgcgacc agggctgcaa cagcgcgag	360
tgcgagtggg acgggctgga ctgtgcggag catgtacccg agaggctggc ggccggcacg	420
ctggtggtgg tgggtctgat gccgccggag cagctgcgca acagctcctt ccacttcctg	480
cgggagctca gccgcgtgct gcacaccaac gtggtcttca agcgtgacgc acacggccag	540
cagatgatct tcccctacta cggccgcgag gaggagctgc gcaagcacc catcaagcgt	600
gccgccgagg gctgggcccgc acctgacgcc ctgctgggcc aggtgaaggc ctcgctgctc	660
cctggtggca gcgaggggtgg gcggcgggcg agggagctgg accccatgga cgtccgcggc	720
tccatcgtct acctggagat tgacaaccgg cagtgtgtgc aggcctcctc gcagtgcctc	780
cagagtgccca ccgacgtggc cgcattcctg ggagcgctcg cctcgctggg cagcctcaac	840
atcccctaca agatcgaggc cgtgcagagt gagaccgtgg agccgcccc gccggcgag	900
ctgcacttca tg	912

<210> 5

<211> 341

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 5

Met	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	His	Pro
1			5					10					15	

Gly	Gly	Ala	Gly	Arg	Asp	Ile	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Glu	Glu	Ala	Cys
			20					25					30		

Glu	Leu	Pro	Glu	Cys	Gln	Val	Asp	Ala	Gly	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Leu
		35					40					45			

Gln	Cys	Asn	Asn	His	Ala	Cys	Gly	Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu
	50					55					60				

Asn	Phe	Asn	Asp	Pro	Trp	Lys	Asn	Cys	Thr	Gln	Ser	Leu	Gln	Cys	Trp
65					70					75					80

Lys	Tyr	Phe	Ser	Asp	Gly	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Cys	Asn	Ser	Ala	Gly
				85					90					95	

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly Gln Cys Asn
 100 105 110
 Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
 115 120 125
 Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
 130 135 140
 Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Leu Val
 145 150 155 160
 Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe His Phe Leu
 165 170 175
 Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
 180 185 190
 Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His Glu Glu Glu
 195 200 205
 Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp Ala Thr Ser
 210 215 220
 Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg Arg Glu Leu Asp
 225 230 235 240
 Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg
 245 250 255
 Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val
 260 265 270
 Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro
 275 280 285
 Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro
 290 295 300
 Ser Gln Leu His Leu Met Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp
 305 310 315 320
 Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Gly Gly Pro Pro His
 325 330 335
 His His His His His

PC71751A-Spanish-Seq Listing

340

<210> 6
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Gln Ile Glu Glu Ala Cys
 1 5 10 15

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Asn Leu
 20 25 30

Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
 35 40 45

Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
 50 55 60

Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
 65 70 75 80

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly Gln Cys Asn
 85 90 95

Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
 100 105 110

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
 115 120 125

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Leu Val
 130 135 140

Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe His Phe Leu
 145 150 155 160

Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
 165 170 175

Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His Glu Glu Glu
 180 185 190

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp Ala Thr Ser
 195 200 205

Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg Arg Glu Leu Asp

PC71751A-Spanish-Seq Listing

210

215

220

Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg
225 230 235 240

Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val
245 250 255

Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro
260 265 270

Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro
275 280 285

Ser Gln Leu His Leu Met
290

<210> 7
<211> 1023
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 7
atgcctctcc tcctcttgct gctcctgctg ccaagcccct tacacgcggg tggcgctggg 60
cgcgacattc cccaccgca gattgaggag gcctgtgagc tgcctgagtg ccagggtggat 120
gcaggcaata aggtctgcaa cctgcagtgt aataatcacg catgtggctg ggatgggtggc 180
gactgctccc tcaacttcaa tgacccctgg aagaactgca cgcagtctct acagtgctgg 240
aagtatttta gcgacggcca ctgtgacagc cagtgaact cggccggctg cctctttgat 300
ggcttcgact gccagctcac cgagggacag tgcaaccccc tgtatgacca gtactgcaag 360
gaccacttca gtgatggcca ctgcgaccag ggctgtaaca gtgccgaatg tgagtgggat 420
ggcctagact gtgctgagca tgtacccgag cggctggcag ccggcaccct ggtgctggtg 480
gtgctgcttc caccgacca gctacggaac aactccttcc actttctgcg ggagctcagc 540
cacgtgctgc acaccaacgt ggtcttcaag cgtgatgcgc aaggccagca gatgatcttc 600
ccgtactatg gccacgagga agagctgcgc aagcaccaa tcaagcgctc tacagtgggt 660
tgggccacct cttactgct tcctggtacc agtgggtggc gccagcgag ggagctggac 720
cccatggaca tccgtggctc cattgtctac ctggagatcg acaaccggca atgtgtgcag 780
tcacctcgc agtgcttcca gagtgccacc gatgtggctg ccttcctagg tgctcttgcg 840
tcacttggca gcctcaatat tccttacaag attgaggccg tgaagagtga gccggtggag 900
cctccgctgc cctcgcagct gcacctcatg ggagggggaa gcggaggcgg actgaacgac 960

PC71751A-Spanish-Seq Listing

atcttcgagg ctcagaaaat cgaatggcac gaaggtggcc caccacatca tcatcatcat 1020
cac 1023

<210> 8
<211> 882
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 8
ggtagcgctg ggcgcgacat tccccaccg cagattgagg aggcctgtga gctgcctgag 60
tgccagggtg atgcaggcaa taaggtctgc aacctgcagt gtaataatca cgcattgtggc 120
tgggatgggtg gcgactgctc cctcaacttc aatgaccctt ggaagaactg cacgcagtct 180
ctacagtgtc ggaagtattt tagcgacggc cactgtgaca gccagtgtgaa ctcggccggc 240
tgccctctttg atggcttcga ctgccagctc accgagggac agtgcaaccc cctgtatgac 300
cagtactgtc aggaccactt cagtgtatggc cactgtgcac agggctgtga cagtgtccga 360
tgtgagtggtg atggcctaga ctgtgtgtgag catgtacccg agcggctggc agccggcacc 420
ctgggtgtgtg tgggtgtgtc tccacccgac cagctacgga acaactcctt ccactttctg 480
cgaggagtca gccacgtgtc gcacaccaac gtgggtcttc agcgtgtatg gcaaggccag 540
cagatgatct tcccgtacta tggccacgag gaagagctgc gcaagcacc aatcaagcgc 600
tctacagtgg gttggggccac ctcttactg cttcctggta ccagtgggtg gcgccagcgc 660
agggagctgg accccatgga catccgtggc tccattgtct acctggagat cgacaaccgg 720
caatgtgtgc agtcattctc gcagtgtctc cagagtgtca ccgatgtggc tgccttccta 780
gggtgtcttg cgtcacttgg cagcctcaat attccttaca agattgaggc cgtgaagagt 840
gagccggtgg agcctccgct gccctcgag ctgcacctca tg 882

<210> 9
<211> 564
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val
35 40 45

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp
 50 55 60
 Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn
 85 90 95
 Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly
 100 105 110
 Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp
 115 120 125
 Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly
 130 135 140
 Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu
 145 150 155 160
 Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe
 165 170 175
 His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe
 180 185 190
 Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg
 195 200 205
 Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp
 210 215 220
 Ala Ala Pro Glu Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp
 245 250 255
 Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val
 260 265 270
 Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe
 275 280 285
 Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile

PC71751A-Spanish-Seq Listing

290

295

300

Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu
305 310 315 320

His Phe Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Pro Lys Ser
325 330 335

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
355 360 365

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
370 375 380

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
385 390 395 400

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
405 410 415

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
420 425 430

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
435 440 445

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
450 455 460

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
465 470 475 480

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
485 490 495

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
500 505 510

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
515 520 525

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
530 535 540

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
545 550 555 560

Ser Pro Gly Lys

<210> 10
<211> 304
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 10

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys
1 5 10 15

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu
20 25 30

Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
35 40 45

Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
50 55 60

Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
65 70 75 80

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn
85 90 95

Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
100 105 110

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
115 120 125

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val
130 135 140

Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
145 150 155 160

Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
165 170 175

Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu
180 185 190

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro
195 200 205

Glu Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly
225 230 235 240

Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser
245 250 255

Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala
260 265 270

Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val
275 280 285

Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met
290 295 300

<210> 11
<211> 1692
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 11
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccggt 60
ggggccgggc gcgacatccc cccgccgctg atcgaggagg cgtgcgagct gcccgagtgc 120
caggaggacg cgggcaacaa ggtctgcagc ctgcagtgca acaaccacgc gtgcggctgg 180
gacggcggtg actgctccct caacttcaat gacccttga agaactgcac gcagtctctg 240
cagtgtgga agtacttcag tgacggccac tgtgacagcc agtgcaactc agccggctgc 300
ctcttcgacg gctttgactg ccagcgtgcg gaaggccagt gcaaccccct gtacgaccag 360
tactgcaagg accacttcag cgacgggcac tgcgaccagg gctgcaacag cgcgagtg 420
gagtgggacg ggctggactg tgcggagcat gtacccgaga ggctggcggc cggcacgctg 480
gtggtggtgg tgctgatgcc gccggagcag ctgcgcaaca gtccttcca cttcctgcgg 540
gagctcagcc gcgtgctgca caccaacgtg gtcttcaagc gtgacgcaca cggccagcag 600
atgatcttcc cctactacgg ccgagaggag gagctgcgca agcaccat caagcgtgcc 660
gccgagggct gggccgcacc tgaagccctg ctgggccagg tgaaggcctc gctgctccct 720
ggtggcggtg gaggtgggag gcggcgagg gagctggacc ccatggacgt ccgcggtcc 780

PC71751A-Spanish-Seq Listing

atcgtctacc tggagattga caaccggcag tgtgtgcagg cctcctcgca gtgcttccag	840
agtgccaccg acgtggccgc attcctggga gcgctgcct cgctgggcag cctcaacatc	900
ccctacaaga tcgaggccgt gcagagtga accgtggagc cgccccgcc ggcgagctg	960
cacttcatgg gagggggcgg atccggcgga ggcggagagc ccaaattctt tgacaaaact	1020
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcttggggg gaccgtcagt cttcctcttc	1080
ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg	1140
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag	1200
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtgggtc	1260
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc	1320
tccaacaaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc	1380
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc	1440
agcctgacct gcctggtaaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	1500
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc	1560
ttcttcctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	1620
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg	1680
tccccgggta aa	1692

<210> 12
 <211> 912
 <212> ADN
 <213> Macaca fascicularis

<400> 12 ggtggggccg ggcgcgacat cccccgccg ctgatcgagg aggcgtgcga gctgcccag	60
tgccaggagg acgcgggcaa caaggctctgc agcctgcagt gcaacaacca cgcgcgggc	120
tgggacggcg gtgactgctc cctcaacttc aatgaccctt ggaagaactg cacgcagtct	180
ctgcagtgtc ggaagtactt cagtgcggc cactgtgaca gccagtgcaa ctcagccggc	240
tgcctcttcg acggccttga ctgccagcgt gcggaaggcc agtgcaaccc cctgtacgac	300
cagtactgca aggaccactt cagcgacggg cactgcgacc agggctgcaa cagcgcgag	360
tgcgagtggg acgggctgga ctgtgcggag catgtacccg agaggctggc ggccggcacg	420
ctggtggtgg tgggtgtgat gccgccggag cagctgcgca acagctcctt ccacttcctg	480
cgggagctca gccgcgtgct gcacaccaac gtggtcttca agcgtgacgc acacggccag	540
cagatgatct tcccctacta cggccgcgag gaggagctgc gcaagcacc catcaagcgt	600
gccgccgagg gctggggccg acctgaagcc ctgctggggc aggtgaaggc ctcgctgctc	660
cctggtggcg gtggagggtg gcggcgggcg agggagctgg accccatgga cgtccgcggc	720

PC71751A-Spanish-Seq Listing

tccatcgtct acctggagat tgacaaccgg cagtgtgtgc aggcctcctc gcagtgcctc	780
cagagtgccca ccgacgtggc cgcattcctg ggagcgctcg cctcgctggg cagcctcaac	840
atcccctaca agatcgaggc cgtgcagagt gagaccgtgg agccgcccc gccggcgag	900
ctgcacttca tg	912

<210> 13
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 13

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

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe
			20					25					30		

Ala	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Thr	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Ala	Ser	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Ser	Leu	Tyr
65					70					75					80

Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Lys	Asp	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Pro	Phe	Val	Met	Asp	Ala
			100					105					110		

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120			

<210> 14
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 14

gcggtacagt tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggaaggct cttgaaactc	60
tcctgtacag cctctggatt cactttcagt agctttgcaa tggcctgggt ccgccaggct	120

PC71751A-Spanish-Seq Listing

ccaacgaagg ggctggagtg ggtcgcatcc attagttatg gtggtgctga cacttactat	180
cgagactccg tgaagggccg attcactatc tccagagata atgcaaaaag cagcctatat	240
ttgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acgtccactt attactgtgc aaaagacctt	300
ccatactacg gatatacccc ctttgttatg gatgcctggg gtcagggaac ttcagtcact	360
gtctcctca	369

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 15

Ser Phe Ala Met Ala
 1 5

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 17
 tccttcgcca tggcc 15

<210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 18
 ggattcacct ttagttcctt cgccatggcc 30

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 19

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

Gly

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 20

Ser Tyr Gly Gly Ala Asp
 1 5

<210> 21
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 21
 tccatctcct atggaggcgc tgacacctac taccgggact ccgtgaaggg c 51

<210> 22
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 22
 cctatggagg cgctgac 17

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 23

Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 24

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 24

gatctgccct actacggcta cacccttc gtgatggacg cc

42

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 25

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

Glu Thr Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 26

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 26

gacatcatgc tgactcagtc tccacctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gaccatcagt	60
ctctcctgca gggccagtca gagaattaac actgacttac attggtatca gcaaaaacca	120
aatgagtctc caaggggttct catcaaattt gcttcccaga ccatctctgg agtcccctcc	180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcactctca atattaacag agtagagcct	240
gaagatTTTT cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccatacac gtttggcgct	300
gggaccaagc tggaactgaa a	321

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 27

Arg	Ala	Ser	Gln	Arg	Ile	Asn	Thr	Asp	Leu	His
1				5					10	

<210> 28

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 28

cgggcctccc agcggatcaa caccgacctg cac	33

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 29

Phe	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser
1				5		

<210> 30

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 30

ttcgccagcc agaccatctc c

21

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 31

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr

1

5

<210> 32

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 32

cagcagtcca actcctggcc ctacacc

27

<210> 33

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 33

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

Ser Leu Lys Val Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 34
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggct cctgaaagtc 60
 tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggactg ggttgcattc attagtagga gtggcagtta catccgctat 180
 gtagacacag tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca ttgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg 300
 caattcgggg actactttga gtactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcctca 357

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 35

His Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Gly Met Asn
 1 5 10

<210> 37
 <211> 15

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos
 <400> 37
 cactatggaa tgaac 15

<210> 38
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos
 <400> 38
 ggattcactt tcagtcacta tggaatgaac 30

<210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos
 <400> 39
 Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos
 <400> 40
 Ser Arg Ser Gly Ser Tyr
 1 5

<210> 41
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos
 <400> 41

PC71751A-Spanish-Seq Listing
tctattagta ggagtggcag ttacatccgc tatgtagaca cagtgaaggg c 51

<210> 42
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos
<400> 42
agtaggagtg gcagttac 18

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos
<400> 43
Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr
1 5 10

<210> 44
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos
<400> 44
gagggacaat tcgggggacta ctttgagtac 30

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos
<400> 45
Asp Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Ile Leu Ile
35 40 45

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu His Ile Asn Thr Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 46
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 46
gacatcatgc tgactcagtc tccagctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gagaatcagt 60
ctctcctgca gggccagtc gaaaattagc actaacttac attggtatca gcaaaagcca 120
aatgagtctc caaggattct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttactctcc atattaacac agtagagcct 240
gaagattttt cagtttatta ctgtcaacag actaatagtt ggccgctcac gttcggttct 300
gggaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 47

Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn Leu His
1 5 10

<210> 48
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 48
agggccagtc agaaaattag cactaactta cat 33

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 49

Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 50
 tatgcttccc agaccatctc t

21

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 51

Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 52
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 52
 caacagacta atagttggcc gctcacg

27

<210> 53
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 53

PC71751A-Spanish-Seq Listing

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Arg Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 54	
gaggtgcagc tagtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggct cctgaaactc	60
tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggag tgaactggat tcgccaggct	120
ccaggggaagg ggctggaatg gattgcatct attagtagaa gtagcagtta catctactat	180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgttc	240
ctgcaattga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg	300
caattcgggg actactttga atactggggc cgaggagtca tggtcacagt ctcctca	357

<210> 55
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 55

PC71751A-Spanish-Seq Listing

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

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 56
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 56
gacatcatatc tgactcagtc tccagctgcc ctgtctgtaa ctccaggaga gagcatcagt 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattaac actaacttgc attggtatca gcaaaaacca 120
aatgagtctc caagggttct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttactctca atattaacag agtagagcct 240
gaagattttt cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccgctcac gttcggttct 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 57
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 57

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

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Thr Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 58	
gaggtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttagtgcagc ctggaaggct cctgaaactc	60
tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct	120
ccaggggaagg ggctggagtg gattacatct attactagta gtagcagtta catctactat	180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg	300
caattcgggg actactttga ttactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcctca	357

<210> 59
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 59

Asp Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Thr Ser Ile Thr Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 62
gagggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggct cctgaaactc 60
tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gattacatct attactagta gtagcagtta catctactat 180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg 300
caattcgggg actactttga ttactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcctca 357

<210> 63
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 63

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

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 64	
gacatcatgc tgactcagtc tccagctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gagcatcagt	60
ctctcctgca gggccagtca gagtattaac actaacttac attggtatca gcaaaaacca	120
aatgagtctc caaggggttct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc	180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttactctca atattaacag agtagagcct	240
gaagattttt cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccgctcac gttcggttct	300
gggaccaagc tggagatcaa a	321

<210> 65
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 65

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

PC71751A-Spanish-Seq Listing

His Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Trp Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Leu Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Asp Phe Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 348
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 66	cagggtgcagg tgaaggagtc aggacctggt ctggtgcagc cctcacagac tttgtctctc	60
	acctgcactg tctctgggtt ctactaacc agctatcatg taagctgggt tcgccagcct	120
	ccaggaaaag gtctggagtg gatgggagca atatggactg gtggaagcac agcatataat	180
	tcacttctca aatccccgact gagcatcagc agggacatct ccaagagcca agttttctta	240
	aaaatgaaca gtctgcaaac tgaagacaca gccacttact actgtgccag agccgatttc	300
	tatgttatgg atgcctgggg tcaaggagct tcagtcactg tctcctca	348

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 67

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

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Asp

PC71751A-Spanish-Seq Listing

20

25

30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Gly Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 68
<211> 320
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 68
acatcatgct gactcagtct ccagttaccc tgtctgtgtc tccaggagag agcatcagtc 60
tctcctgcag ggccagtcag agtattagca ctgacttgca ttggtatcag caaaaaccaa 120
atgagtctcc aagggttctc atcaaatatg gttcccagac catctctgga atcccctcca 180
ggttcagtg gagggtatca gggacagatt tcactctcaa tattaacaga gtagagcctg 240
aagatttttc agtttattac tgtcagcaga gtaatagctg gccatggaca ttcggtggag 300
gcaccaagct ggaattgaaa 320

<210> 69
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 70
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 70
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgcca tggcctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctcctatg gaggcgctga cacctactac 180
 cgggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 ccctactacg gctacacccc ctctgtgatg gacgcctggg gccagggaac cctgggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 71
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 Página 34

PC71751A-Spanish-Seq Listing

20

25

30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 72
<211> 369
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 72
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgccca tggcctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctcctatg gaggcgctga cacctactac 180
cgggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaggatctg 300
ccctactacg gctacacccc cttcgtgatg gacgcctggg gccaggggaac cctgggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 73

Ser Phe Ala Met Ala
1 5

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 74

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met Ala
 1 5 10

<210> 75
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 75
 tccttcgcca tggcc 15

<210> 76
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 76
 ggattcacct ttagttcctt cgccatggcc 30

<210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 77

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

Gly

<210> 78
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 78

Ser Tyr Gly Gly Ala Asp
1 5

<210> 79

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 79

tccatctcct atggaggcgc tgacacctac taccgggact ccgtgaaggg c 51

<210> 80

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 80

cctatggagg cgctgac 17

<210> 81

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 81

Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 82

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 82

gatctgccct actacggcta cacccttc gtgatggacg cc 42

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 83

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 84

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 84

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<400> 85

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 86

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 86

gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 87

PC71751A-Spanish-Seq Listing

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 88
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 88
gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 89
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 89

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

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 90
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 90	
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagggtgct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag	300
gggaccaagc tggagatcaa a	321

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 92
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 92
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 93

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
Página 42

35

Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 94
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 94
gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagggtgct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 95
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 95

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 96
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 96
gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 97

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 98
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 98
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp Leu His
1 5 10

<210> 100
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 100
cgggcctccc agcggatcaa caccgacctg cac 33

<210> 101
<211> 7

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 101

Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser
1 5

<210> 102
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 102
ttcgccagcc agaccatctc c

21

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 103

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 104
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 104
cagcagtcca actcctggcc ctacacc

27

<210> 105
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 105

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

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 106
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 106	
gacatcatgc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag	300
gggaccaagc tggagatcaa a	321

<210> 107
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 107

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 108
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 108	
gacatcatgc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaggggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag	300
gggaccaagc tggagatcaa a	321

<210> 109
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 109

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Val Leu Ile
Página 48

35

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 110
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 110
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaggggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 111
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 111

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 112
<211> 1359
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 112
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgcca tggcctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctcctatg gaggcgctga cacctactac 180
cgggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaggatctg 300
ccctactacg gctacacccc cttcgtgatg gacgcctggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctcag cgtcgaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420

PC71751A-Spanish-Seq Listing

acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg	480
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc	600
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaaa	660
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaagcc	720
gctggggcac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc	780
cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag	840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag	900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg	960
aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1020
accatctcca aagccaaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc	1140
agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag	1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag	1260
agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac	1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaa	1359

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 113

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Arg	Ile	Asn	Thr	Asp
			20					25					30		

Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Leu	Ile
		35					40					45			

Lys	Phe	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 114
<211> 642
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 114
gacatcatgc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtgc gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccctacac ctttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

PC71751A-Spanish-Seq Listing

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 115
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 116
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 116

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt cactacggca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctccagat ccggctccta catcagatac 180

PC71751A-Spanish-Seq Listing

gtggacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggc	300
cagttcggcg actacttcga gtactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctca	357

<210> 117
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 117

His Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 118
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 118

Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Gly Met Asn
 1 5 10

<210> 119
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 119
 cactatggaa tgaac 15

<210> 120
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 120
 ggattcactt tcagtcacta tggaatgaac 30

<210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos
 <400> 121
 Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 122
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos
 <400> 122

Ser Arg Ser Gly Ser Tyr
 1 5

<210> 123
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 123
 tctattagta ggagtggcag ttacatccgc tatgtagaca cagtgaaggg c 51

<210> 124
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 124
 agtaggagtg gcagttac 18

<210> 125
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 125

Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr

PC71751A-Spanish-Seq Listing
10

1

5

<210> 126
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 126
gagggacaat tcggggacta ctttgagtac

30

<210> 127
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 127

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 128
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 128
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc

60

PC71751A-Spanish-Seq Listing

atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagtcctt gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 129
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos
 <400> 129

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 130
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos
 <400> 130

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca	120

PC71751A-Spanish-Seq Listing

gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 131
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 131

Arg	Ala	Ser	Gln	Lys	Ile	Ser	Thr	Asn	Leu	His
1				5					10	

<210> 132
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 132	
agggccagtc agaaaattag cactaactta cat	33

<210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 133

Tyr	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser
1				5		

<210> 134
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 134	
tatgcttccc agaccatctc t	21

<210> 135
 <211> 10

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 135

Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu Thr Thr
1 5 10

<210> 136
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 136
caacagacta atagttggcc gctcacg

27

<210> 137
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 137

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 138

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 138
 gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaactgc actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 139
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 139
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 140
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 140

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagatcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 141

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 141

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Lys	Ile	Ser	Thr	Asn
			20					25					30		

Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50						55				60					

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Trp	Pro	Leu
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
		100						105		

<210> 142

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

PC71751A-Spanish-Seq Listing

<400> 142
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 143
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 143

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 144
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 144
gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

PC71751A-Spanish-Seq Listing

atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagatcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 145
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos
 <400> 145

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 146
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos
 <400> 146

gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca	120

PC71751A-Spanish-Seq Listing

gggaaagccc ctaagctcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 147
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 147

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Lys	Ile	Ser	Thr	Asn
			20					25					30		

Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ile	Leu	Ile
		35					40					45			

Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Trp	Pro	Leu
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105		

<210> 148
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 148

gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240

PC71751A-Spanish-Seq Listing

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 149
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos

<400> 149

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

PC71751A-Spanish-Seq Listing

Lys

<210> 150
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos
 <400> 150
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt cactacggca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctccagat ccggctccta catcagatac 180
 gtggacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggc 300
 cagttcggcg actacttcga gtactggggc caggggaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 151
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética de péptidos
 <400> 151
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

PC71751A-Spanish-Seq Listing

100

105

110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 152

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

<400> 152

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321



(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2011/055595

(22) International Filing Date:
9 December 2011 (09.12.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/423,578 15 December 2010 (15.12.2010) US
61/552,578 28 October 2011 (28.10.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **WYETH LLC** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GELES, Kenneth, G.** [US/US]; Pfizer Inc., 401 North Middletown Road, Building 140 - 4th Floor, Pearl River, NY 10965 (US). **ZHOU, Bin-Bing, Stephen** [US/US]; 18 Prescott Road, Ho Ho Kus, NJ 07423 (US). **TCHISTIAKOVA, Lioudmila, Gennadievna** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US). **GAO, Yijie** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US). **BARD, Joel** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US).

(74) Agent: **POKRAS, Bruce A.**; Wyeth LLC, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, 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, RS, 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))
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:
4 October 2012

(54) Title: ANTI-NOTCH1 ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention provides for antibodies that bind to Notch1. The present disclosure also provides methods of making the antibodies, pharmaceutical compositions comprising these antibodies and methods of treating disorders with the antibodies and pharmaceutical compositions.



WO 2012/080926 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/055595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WU YAN ET AL: "Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 464, no. 7291, 15 April 2010 (2010-04-15), pages 1052-1058, XP009137924, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE08878	17-21, 24-34
Y	the whole document	1-16, 22, 23
X	----- WO 2008/150525 A1 (GENENTECH INC [US]; SIEBEL CHRISTIAN W [US]; WU YAN [US]) 11 December 2008 (2008-12-11)	17-21, 24-34
Y	the whole document	1-16, 22, 23
----- -/--		
☒ 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 17 April 2012	Date of mailing of the international search report 13/07/2012	
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 Kalsner, Inge	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/055595

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GORDON WENDY R ET AL: "Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, UNITED STATES, vol. 113, no. 18, 30 April 2009 (2009-04-30), pages 4381-4390, XP009120471, ISSN: 1528-0020, DOI: 10.1182/BLOOD-2008-08-174748 the whole document -----	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2011/055595

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-34

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-34

antibody that binds to Notch 1, nucleic acid sequence encoding it, vector, host cell, process for producing it, pharmaceutical composition, method of treating a disorder which is associated with abnormal activation of Notch 1, such as T-ALL, NSCLC and breast cancer, wherein the antibody is defined by the amino acid sequences of its heavy and light chain SEQ ID NO:111 and 113, respectively

2. claims: 35-45

as above, but with respect to the antibody defined by SEQ ID NO: 149 and 151

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/055595

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008150525	A1	11-12-2008	
		AR 066846 A1	16-09-2009
		AU 2008260439 A1	11-12-2008
		CA 2687866 A1	11-12-2008
		CN 101796074 A	04-08-2010
		CO 6150200 A2	20-04-2010
		CR 11139 A	30-12-2009
		EC SP099785 A	29-01-2010
		EP 2152748 A1	17-02-2010
		JP 2011504091 A	03-02-2011
		KR 20100021581 A	25-02-2010
		MA 31502 B1	01-07-2010
		NZ 581303 A	29-06-2012
		PE 03212009 A1	20-04-2009
		RU 2009149462 A	20-07-2011
		TW 200906856 A	16-02-2009
		US 2009081238 A1	26-03-2009
		WO 2008150525 A1	11-12-2008
