

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 405**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2009 E 09808518 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2326345**

54 Título: **Proteínas de fusión basadas en Notch3 humanas como inhibidores señuelo de la señalización de Notch3**

30 Prioridad:

**22.08.2008 US 189930 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.03.2015**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN  
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)  
West 116th Street and Broadway  
New York, NY 10027 , US**

72 Inventor/es:

**KITAJEWSKI, JAN y  
SHAWBER, CARRIE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 532 405 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión basadas en Notch3 humanas como inhibidores señuelo de la señalización de Notch3

A lo largo de esta descripción, se hace referencia a varias publicaciones por números arábigos en paréntesis o por autor y fecha de publicación en paréntesis. Las citas completas de estas publicaciones pueden encontrarse al final de la especificación.

**Antecedentes de la invención**

Desarrollo vascular

Durante la embriogénesis de mamíferos, la formación del sistema vascular es un proceso temprano y esencial. En el embrión, el desarrollo vascular se inicia con el hemangioblasto pluripotente derivado del mesodermo de la placa paraxial y lateral. El hemangioblasto tiene el potencial de diferenciarse bien en un progenitor hematopoyético o un progenitor de células endoteliales, conocido como el angioblasto.

El desarrollo vascular empieza con un proceso conocido como vasculogénesis mediante el cual los angioblastos se diferencian en células endoteliales y migran conjuntamente para formar el plexo vascular primitivo. Esta red vascular inicial consiste en vasos que son homogéneos en tamaño y comprenden en su totalidad células endoteliales. El plexo vascular se remodela entonces mediante angiogénesis.

La angiogénesis implica la aparición de nuevos vasos, la migración de estos vasos a regiones avasculares, y el reclutamiento de células accesorias, pericitos y células de músculo liso (Gale y Yancopoulos, 1999). Las células de músculo liso que se diferencian y forman las paredes de los vasos contráctiles se originan de múltiples progenitores incluyendo células de la cresta neural, células mesenquimales e incluso células endoteliales (Owens, 1995). En los adultos, la angiogénesis está implicada en el desarrollo folicular, cicatrización de heridas, y procesos patológicos tales como angiogénesis tumoral y enfermedad cardíaca.

La familia Notch y ligandos Notch

Los estudios de *Drosophila*, *C. elegans*, pez cebra y mamíferos han demostrado que la ruta Notch es un mecanismo de señalización evolutivamente conservado que funciona para modular numerosas decisiones del destino celular. La señalización Notch se requiere para la formación del patrón apropiado de células que se originan de las tres capas germinales. Dependiendo del contexto celular, la señalización Notch puede tanto inhibir como inducir la diferenciación, inducir la proliferación, y estimular la supervivencia celular (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Lewis, 1998; Weinmaster, 1997). En *Drosophila*, una única proteína Notch se activa por dos ligandos, Serrate y Delta. En mamíferos, estas familias se han expandido a cuatro genes Notch (Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4) y cinco ligandos, 2 semejantes a Serrate (Jagged1-2) y 3 Delta (D11, 3, 4) (Bettenhausen et al., 1995; Dunwoodie et al., 1997; Gallahan y Callahan, 1997; Lardelli et al., 1994; Lindsell et al., 1995; Shawber et al., 1996a; Shutter et al., 2000a; Uyttendaele et al., 1996; Weinmaster et al., 1992; Weinmaster et al., 1991). Durante la embriogénesis, los receptores y ligandos Notch se expresan en patrones espaciales y temporales dinámicos. Sin embargo, no se sabe si todos los ligandos activan todos los receptores.

Señalización y función de Notch

La señalización Notch influye en muchos tipos diferentes de decisiones del destino celular proporcionando señales inhibitoras, inductoras o proliferativas dependiendo del contexto medioambiental (revisado en Artavanis-Tsakonas et al., 1996; Greenwald, 1998; Robey, 1997; Vervoort et al., 1997). Esta función pleiotrópica sugiere que Notch modula múltiples rutas de señalización de una manera espacio-temporal.

Consistente con la regulación por Notch de decisiones del destino celular, tanto los receptores como los ligandos son proteínas de la superficie celular con dominios transmembrana únicos (Figura 1). El dominio regulador extracelular de las proteínas Notch consiste en gran medida en repeticiones semejantes a EGF organizadas en tándem que se requieren para la unión del ligando (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Weinmaster, 1998). En el extremo C terminal de las repeticiones semejantes a EGF se encuentran tres repeticiones ricas en cisteína adicionales, designadas las repeticiones LIN12/Notch (LNR) (Greenwald, 1994). Aguas abajo de LNR se encuentra la secuencia de escisión proteolítica (RXRR) que es reconocida por una convertasa semejante a furina. Para Notch1, la escisión en este sitio rinde un péptido extracelular de 180 kilodaltons y un péptido intracelular de 120 kilodaltons que se mantienen juntos para generar un receptor heterodimérico en la superficie celular (Blaumueller et al., 1997; Kopan et al., 1996; Logeat et al., 1998).

El dominio intracelular de Notch (NotchICD, Figura 1), rescata los fenotipos de pérdida de función de Notch lo que indica que esta forma de Notch produce la señal constitutivamente (Fortini y Artavanis-Tsakonas, 1993; Lyman y Young, 1993; Rebay et al., 1993; Struhl et al., 1993).

El dominio citoplásmico de Notch contiene tres dominios identificables: el dominio RAM, el dominio de repetición de anquirina y el dominio PEST C terminal (Figura 1). Después de la activación por el ligando, Notch experimenta dos escisiones proteolíticas adicionales que resultan en la liberación del dominio citoplásmico (Weinmaster, 1998). Este

péptido Notch se transloca al núcleo e interacciona con los represores transcripcionales conocidos como CSL (CBF, Su (H), Lag-2) y lo convierte en activador transcripcional. La interacción CSL/Notch depende de la presencia del dominio RAM de Notch; mientras, la actividad transcripcional también requiere la presencia de las repeticiones de anquirina (Hsieh et al., 1996; Hsieh et al., 1997; Roehl et al., 1996; Tamura et al., 1995; Wettstein et al., 1997). Los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* indican que los genes HES y Hey son dianas directas de la señalización dependiente de Notch/CSL (Bailey y Posakony, 1995; Eastman et al., 1997; Henderson et al., 2001; Jarriault et al., 1995; Nakagawa et al., 2000; Wettstein et al., 1997). Los genes HES y Hey son represor transcripcional bHLH que se unen al ADN en las cajas N (Nakagawa et al., 2000; Sasai et al., 1992; Tietze et al., 1992). Se ha propuesto que Notch señala por una ruta independiente de CSL. De hecho, sólo es necesaria y suficiente la expresión del dominio de repetición de anquirina para algunas formas de señalización de Notch (Lieber et al., 1993; Matsuno et al., 1997; Shawber et al., 1996b).

Finalmente, el dominio PEST se ha implicado en la velocidad de recambio de proteínas por una ruta dependiente de SEL-10/ubiquitina (Greenwald, 1994; Öberg et al., 2001, Rogers et al., 1986; Wu et al., 1998; Wu et al., 2001). De manera similar a los receptores, el dominio extracelular de los ligandos Notch también consiste en gran medida en repeticiones semejantes a EGF organizadas en tándem (Figura 1). Aguas arriba de estas repeticiones se encuentra una repetición semejante a EGF divergente conocida como el DSL (Delta, Serrate, Lag-2) que se requiere para la unión del ligando y la activación de los receptores (Artavanis-Tsakonas et al., 1995).

#### Señalización Notch y desarrollo vascular

Aunque se han identificado muchos de los genes que funcionan para inducir la vasculogénesis y angiogénesis, poco se sabe acerca de cómo las decisiones del destino celular se especifican durante el desarrollo vascular. Varias de las observaciones sugieren que la ruta de señalización Notch puede jugar un papel en la determinación y formación de patrones del destino celular del sistema vascular.

Notch1, Notch4, Jagged1 y D114 todos se expresan en la vasculatura en desarrollo, mientras Notch3 se expresa en las células del músculo liso accesorias (Krebs et al., 2000; Shuttler et al., 2000b; Uyttendaele et al., 1996; Villa et al., 2001; Xue et al., 1999). Los ratones que carecen de Jagged1 son letales en el estadio embrionario y tienen defectos vasculares graves (Xue et al., 1999). Los ratones nulicigotos para Notch1 son letales en el estadio embrionario y mueren de defectos neuronales graves, pero también tienen defectos en la angiogénesis (Krebs et al., 2000; Swalatek et al., 1994). Los ratones que carecen de Notch4 nacen y parecen normales, pero los embriones que han perdido tanto Notch1 como Notch4 mueren en E9.5 de hemorragias graves y defectos en el patrón vascular indicando que Notch1 y Notch4 pueden ser funcionalmente redundantes durante el desarrollo vascular (Krebs et al., 2000). La expresión exógena de una forma activada de Notch4 en el endotelio también resultó en defectos vasculares similares a los observados para los ratones nulicigotos dobles Notch1/Notch4, sugiriendo que son críticos niveles apropiados de la señalización Notch para el desarrollo apropiado de la vasculatura embrionaria (Uyttendaele et al., 2001).

Tomados conjuntamente, los datos de ratones mutantes para los componentes de la señalización Notch/Notch descubren varios procesos dependientes de Notch incluyendo remodelado vascular, especificación venosa arterial, reclutamiento de células del músculo liso vascular y desarrollo de vasos de salida de flujo corazón/corazón.

Experimentos recientes han implicado a la señalización Notch en la especificación de células endoteliales arteriales/venosas. El análisis *in situ* de embriones E13.5 encontró que la expresión de Notch1, Notch3, Notch4, D14, Jagged1 y Jagged2 estaba restringida a las arterias y estaba ausente en las venas (Villa et al., 2001). Consistente con los datos de expresión, la disrupción de la señalización de Notch en el pez cebra se asoció con la pérdida del marcador arterial efrinaB2; mientras, la expresión ectópica de una forma activada de Notch dio lugar a una pérdida en el marcador celular venoso EphB4 en la aorta dorsal (Lawson et al., 2001). Estos datos sugieren que la señalización Notch puede ayudar a especificar los destinos celulares arteriales y venosos durante la angiogénesis.

Tomados conjuntamente, los datos de ratones mutantes para los componentes de la señalización Notch/Notch descubren varios procesos dependientes de Notch incluyendo remodelado vascular, especificación venosa arterial, reclutamiento de células del músculo liso vascular y desarrollo de vasos de salida de flujo corazón/corazón.

También se ha sugerido que la señalización Notch funciona en el sistema vascular adulto. En los seres humanos, las mutaciones con cambio de sentido en el dominio extracelular de Notch3 se correlacionan con el desarrollo de la enfermedad vascular degenerativa, CADASIL (US 2003/186290 presentada el 2 de octubre, 2003 de Bach et al.; Caronti et al., 1998; Desmond et al., 1998; Joutel et al., 2000; Joutel et al., 1996). En un modelo de cicatrización de heridas, se observó una expresión incrementada de Jagged1 en el borde de la herida endotelial que se estaba regenerando, lo que sugiere que la señalización Notch puede funcionar durante procesos de angiogénesis en el adulto (Lindner et al., 2001). Tomados conjuntamente, estos datos apoyan que la señalización Notch funciona en varias etapas críticas durante el desarrollo vascular: vasculogénesis, formación de patrones vasculares/angiogénesis, y especificación arterial/venosa. Sin embargo, todavía deben elucidarse el o los mecanismos moleculares por los que las rutas de señalización Notch influyen en estas diferentes etapas.

## Significancia

Shimizu et al. (J. Biol. Chem. 274(46): 32961-32969 (1999)) describen el uso de Notch1ECD/Fc, Notch2ECD/Fc y Notch3ECD/Fc en estudios de unión. Sin embargo, Shimizu et al. no mencionan el uso de dichas proteínas para inhibir la angiogénesis.

- 5 La Patente U.S. No. 6.379.925 presentada el 30 de abril, 2002 de Kitajewski et al. describe Notch4 murino. Sin embargo, no describe proteínas de fusión basadas en Notch como se muestra en la presente solicitud.

10 WO 2006/047878 presentada el 11 de mayo, 2006 de Karsan y Leong, US 2006/030694 presentada el 9 de febrero, 2006 de Kitajewski et al. y US 2008/118520 presentada el 22 de mayo, 2008 de Li et al. describen proteínas y proteínas de fusión basadas en Notch, respectivamente, y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con Notch. Sin embargo, ninguna de ellas describe proteínas de fusión como se muestra en la presente solicitud.

15 Las proteínas Notch juegan papeles clave en las decisiones de desarrollo que implican la vasculatura, el sistema hematopoyético, y el sistema nervioso. Como tal, una comprensión de su función es clave para entender cómo se controlan las decisiones y compromiso del destino celular durante el desarrollo y en los tejidos adultos. Hasta la fecha, varias publicaciones sobre disrupciones de genes Notch o ligando Notch han descrito fenotipos vasculares proporcionando énfasis en que esta ruta es una parte fundamental de la maquinaria que guía el desarrollo vascular. La actividad de Notch aberrante se ha ligado a patologías humanas; incluyendo tanto cáncer como trastornos vasculares (CADASIL). El análisis de Notch en la angiogénesis tumoral sólo ha empezado recientemente; sin embargo, nuestro descubrimiento de dianas potenciales aguas abajo de Notch sugiere un papel en los procesos patológicos asociados con la angiogénesis. Por ejemplo, VEGFR-3 se ha ligado tanto a angiogénesis tumoral como a linfangiogénesis tumoral. La expresión o función de varias otras dianas potenciales Notch también se ha ligado a angiogénesis tumoral; incluyendo EfrinaB2, Id3, Angiopoyetina 1, y PDGF-B. Una mayor comprensión sobre el papel de estas dianas en las que funciona el gen Notch facilitará claramente el análisis futuro de Notch en las patologías humanas.

**Compendio de la invención**

25 La invención se refiere a una proteína de fusión y al uso de ésta como se define en las reivindicaciones. Esta descripción se refiere generalmente a una proteína de fusión que comprende un péptido señal, repeticiones de EGF 1-X del dominio extracelular de la proteína receptora Notch3 humana en la que X es cualquier número entero de 12 a 34, y una parte Fc de un anticuerpo unido a ella.

30 Esta descripción describe una proteína de fusión que comprende un péptido señal, repeticiones de EGF 1-X del dominio extracelular de la proteína receptora Notch3 humana en la que X es cualquier número entero de 1 a 10, y una parte Fc de un anticuerpo unido a ella.

Esta descripción describe una proteína de fusión que comprende un péptido señal, al menos 12 repeticiones de EGF del dominio extracelular del receptor Notch3 humano, y una parte Fc de un anticuerpo unido a ella.

35 Esta descripción describe una proteína de fusión que comprende un péptido señal, repeticiones de EGF del dominio extracelular de la proteína receptora Notch3 humana, en la que están presentes al menos 12 repeticiones de EGF, y una parte Fc de un anticuerpo unido a ella.

Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para tratar un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para tratar al sujeto, tratando de esta manera al sujeto que tiene un tumor.

40 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir la angiogénesis en el sujeto, inhibiendo de esta manera la angiogénesis en el sujeto.

45 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para tratar el cáncer de ovario en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para tratar al sujeto, tratando de esta manera al sujeto que tiene cáncer de ovario.

Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor en un sujeto.

50 Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la angiogénesis en un sujeto.

Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer de ovario en un sujeto.

Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto.

5 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir la linfangiogénesis fisiológica o linfangiogénesis patológica en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir la linfangiogénesis fisiológica o linfangiogénesis patológica en el sujeto.

10 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir la metástasis tumoral en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir la metástasis tumoral en el sujeto. Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor secundario en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir el crecimiento del tumor secundario en el sujeto.

15 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir la cooperación de vasos sanguíneos por un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir la cooperación de vasos sanguíneos por un tumor en el sujeto.

20 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto.

Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del receptor de VEGF para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del receptor de VEGF, cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto.

25 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto.

30 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un antagonista del receptor de PDGF para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un antagonista del receptor de PDGF, cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto.

35 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor de HER2/neu para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor de HER2/neu, cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto.

Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para tratar cáncer de mama en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para tratar el cáncer de mama en el sujeto.

40 Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para tratar cáncer de mama en un sujeto.

### Descripción breve de las figuras

Figura 1

45 Esta Figura muestra la estructura esquemática de Notch y ligandos Notch: Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Jagged-1, Jagged-2, semejante a Delta 1, semejante a Delta 3, semejante a Delta 4.

Figura 2

Esta Figura muestra el diseño esquemático de proteínas de fusión basadas en Notch (NotchECD/Fc). El dominio extracelular de Notch1, Notch2, Notch3, o Notch4 que contiene las repeticiones de EGF se fusiona con la parte Fc de un anticuerpo.

50 Figura 3

Esta Figura muestra un ensayo de co-cultivo para ensayar la actividad de las proteínas de fusión basadas en Notch. Notch y los informadores transcripcionales que responden a Notch se expresan en una célula "que responde a

Notch", HeLa. Los ligandos Notch, Jagged-1, semejante a Delta 1, o semejante a Delta 4 se expresan en una célula "presentadora de ligando", 293. La expresión está mediada por la transfección de poblaciones celulares individuales, las células se co-cultivan, y se ensayan para actividad informadora dependiente de Notch.

Figura 4

5 Esta Figura muestra la actividad inhibidora de la proteína de fusión basada en Notch frente a la activación de la señalización Notch por la interacción entre Notch y ligando Notch. La inducción de la señalización Notch se detectó por co-cultivo tanto del tipo Notch1 como 3 de células que expresan ligando Notch y estas inducciones se inhibieron por co-transfección de un vector que expresa la proteína de fusión basada en Notch en células que expresan Notch1. Por lo tanto, las proteínas de fusión basadas en Notch pueden usarse como inhibidor de Notch tomando  
10 como base la inhibición de la interacción entre Notch y ligando Notch.

Figura 5

Esta Figura muestra la expresión de la proteína de fusión basada en Notch1 (Notch1ECD/Fc) en 293. *Panel A*: expresión en lisados celulares (lys) o secretada en el medio (sup). *Panel B*: expresión en lisados de 293 de NECD/Fcs, como se lista.

15 Figura 6

Esta Figura muestra la activación de la señalización Notch en HUVEC infectadas con adenoviral que codifica VEGF-165. La activación de la señalización Notch puede detectarse usando actividad promotora CBF1. La actividad transcripcional del promotor CBF1 se activa por la unión de Notch-1C a CBF1. Medimos la actividad promotora CBF1 en HUVEC que se infectó con adenovirus que codifica VEGF-165 a diferentes MOI. La inducción del promotor CBF1 se detectó claramente en HUVEC infectadas con Ad-VEGF, comparado con células infectadas con Ad-LacZ de una manera dependiente de MOI. Estos datos mostraron que la sobreexpresión de VEGF podía activar la señalización Notch en HUVEC.  
20

Figura 7

Esta Figura muestra el efecto de las proteínas de fusión basadas en Notch en la activación inducida por VEGF de la señalización Notch. La co-infección de la proteína de fusión basada en Ad-Notch con Ad-VEGF redujo claramente la activación de la actividad promotora de CBF1 inducida por la infección con Ad-VEGF solo. En el caso de infección a 40 MOI para cada adenovirus en el panel A, se detectó una inhibición del 60% a las 24 horas y una inhibición del 90% a las 48 horas después de la transfección del gen informador. Esta actividad inhibidora de la trampa Notch fue dependiente de MOI de la proteína de fusión basada en Ad-Notch.  
25

30 Figura 8

Esta Figura muestra un experimento en el que evaluamos el efecto de las proteínas de fusión basadas en Notch en la inducción de gemación por VEGF-165 sobreexpresado en HUVEC. Cuando HUVEC infectadas con Ad-VEGF se cultivaron en gel de tipo colágeno durante 8 días, se indujo la gemación en el gel de colágeno. Esta inducción de la gemación por VEGF sobreexpresado se inhibió claramente por coinfección de adenovirus que codifican proteínas de fusión basadas en Notch. La proteína de fusión basada en Ad-Notch en sí misma tuvo menos efecto en la morfología.  
35

Figura 9

Esta Figura muestra el resultado del recuento de yemas por campo con microscopio. La infección con Ad-VEGF en HUVEC incrementó el número de yemas dependiendo del MOI usado. Aunque se usó un medio de MOI de proteína de fusión basada en Notch, comparado con Ad-VEGF, la gemación inducida por Ad-VEGF se inhibió claramente. Estos datos sugirieron que VEGF indujo la gemación de HUVEC mediante la activación de la señalización Notch y que la proteína de fusión basada en Notch pudo inhibir la gemación inducida por VEGF.  
40

Figura 10

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína Notch1 de rata (SEQ ID NO:1) y una secuencia conectora (SEQ ID NO:2).  
45

Figura 11

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína Notch2 de rata (SEQ ID NO:3) y una secuencia conectora (SEQ ID NO:2).

Figura 12

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína Notch3 de ratón (SEQ ID NO:4).  
50

Figura 13

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína Notch4 de ratón (SEQ ID NO:5) y una secuencia conectora (SEQ ID NO:2).

Figuras 14A y 14B

- 5 Esta Figura muestra la secuencia de ácido nucleico del dominio extracelular del gen de Notch1 de rata (SEQ ID NO:6).

Figuras 15A y 15B

Esta Figura muestra la secuencia de ácido nucleico del dominio extracelular del gen de Notch2 de rata (SEQ ID NO:7).

- 10 Figuras 16A y 16B

Esta Figura muestra la secuencia de ácido nucleico del dominio extracelular del gen de Notch3 de ratón (SEQ ID NO:8).

Figuras 17A y 17B

- 15 Esta Figura muestra la secuencia de ácido nucleico del dominio extracelular del gen de Notch4 de ratón (SEQ ID NO:9) y la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO:10) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de una secuencia conectora.

Figuras 18A y 18B

Esta Figura muestra la secuencia de ácido nucleico del dominio extracelular del gen de Notch1 humano (SEQ ID NO:11).

- 20 Figuras 19A y 19B

Esta Figura muestra la secuencia de ácido nucleico del dominio extracelular del gen de Notch2 humano (SEQ ID NO:12).

Figuras 20A y 20B

- 25 Esta Figura muestra la secuencia de ácido nucleico del dominio extracelular del gen de Notch3 humano (SEQ ID NO:13).

Figuras 21A y 21B

Esta Figura muestra la secuencia de ácido nucleico del dominio extracelular del gen de Notch4 humano (SEQ ID NO:14).

Figuras 22A-22I

- 30 Estas Figuras muestran que VEGF activa la señalización Notch para inducir la gemación de HUVEC. Se transdujeron HUVEC con Ad-VEGF a 40 MOI (Figs. 22A, 22H, 22I) ó 20 MOI (Figs. 22C, 22G). Ad-LacZ se co-transdujo en HUVEC para conseguir la misma cantidad total de adenovirus 60 MOI (Fig. 22G), 80 MOI (Fig. 22A) y 100 MOI (Figs. 22H, 22I). La Figura 22A muestra el análisis por RT-PCR de la expresión de Notch y ligando Notch. Los números muestran los ciclos de PCR. La Figura 22B muestra el efecto de VEGF transducido en la actividad informadora CSL. La Figura 22C muestra el efecto de SU5416 en la actividad informadora CSL transactivado con Ad-VEGF. La Figura 22D muestra la construcción de señuelo Notch (N1ECDFc). La Figura 22E muestra la secreción de N1ECDFc de HUVEC transducidas con Ad-N1ECDFc. La Figura 22F muestra el efecto de N1ECDFc frente a la actividad informadora CSL inducida por ligando en un ensayo de co-cultivo (□: (-); ■: 0,33 ng pHyTC-N1ECDFc; ■: 0,67 ng pHyTC-N1ECDFc). Las Figuras 22G-I muestran el efecto de N1ECDFc frente a HUVEC transducidas con Ad-VEGF. La señalización Notch se activó con la transducción de Ad-VEGF en HUVEC en ausencia o presencia de co-transducción de Ad-N1ECDFc a la dosificación indicada. La Figura 22G muestra el efecto de N1ECDFc en la actividad informadora CSL transactivada por Ad-VEGF. La Figura 22H muestra la inhibición de la gemación de HUVEC transducidas con Ad-VEGF con co-transducción de Ad-N1ECDFc a 40 MOI. La Figura 22I muestra la cuantificación del efecto de N1ECDFc en la gemación de HUVEC transducidas con Ad-VEGF (□: bud; ■: número de células).
- 35
- 40
- 45

Figuras 23A-23J

Estas Figuras muestran que la señalización Notch regula al alza la expresión de Flt1 para inducir la gemación de HUVEC. Se transdujeron HUVEC bien con Ad-LacZ o Ad-N1IC a 40 MOI. Las Figuras 23A-23C muestran el efecto de inhibidores para las tirosina quinasas de receptores en la gemación de HUVEC inducida por Notch. La Figura 23A

es una fotografía de la gemación de HUVEC transducidas con Ad-N11C tratadas con PD166866, ZD1893 a 1  $\mu$ M y SU5416 a 0,5  $\mu$ M. La Figura 23B muestra la cuantificación del efecto de los inhibidores a 1  $\mu$ M ( $\square$ : bud;  $\blacksquare$ : número de células). La Figura 23C muestra la dependencia de la dosis del efecto de SU5416 ( $\square$ : bud;  $\blacksquare$ : número de células). Las Figuras 23D-E muestran la inducción de la expresión de Flt-1 en HUVEC transducidas con Ad-N11C. La Figura 23D muestra el análisis por RT-PCR de la expresión del ARNm de Flt-1. La Figura 23E muestra el análisis W.B. de la expresión de la proteína Flt-1. Las Figuras 23F-G muestran la estimulación de la gemación de HUVEC inducida por Notch con estimulación con P1GF. Se cultivaron HUVEC transducidas con Ad-N11C en gel de colágeno con SFM, en lugar de medio completo, en ausencia o presencia de 50 ng/ml de P1GF. La Figura 23F muestra la gemación inducida por P1GF de HUVEC transducidas con Ad-N11C (cabeza de flecha: yemas con filopodia única; flecha: yemas con múltiples filopodias). La Figura 23G muestra la cuantificación del efecto de P1GF en la gemación de HUVEC transducidas con Ad-N11C ( $\square$ : multi; E: total). Las Figuras 23H-I muestran el efecto de la transfección de siARN de Flt-1 en la expresión de Flt-1. Se transfectaron HUVEC transducidas con Ad-N11C con 200 pmoles bien de siARN control (CT) o de Flt-1. La Figura 23H muestra la reducción de la expresión del ARNm de Flt-1. La Figura 23I muestra la reducción de la expresión de la proteína Flt-1. La Figura 23J muestra el efecto de la transfección de siARN de Flt-1 en la gemación de HUVEC inducida por Notch. Se transfectaron HUVEC transducidas con Ad-N11C bien con 100 ó 200 pmoles de siARN y se cultivaron en gel de colágeno durante 2 días.

#### Figuras 24A-24E

Estas Figuras muestran que VEGF regula la actividad gelatinasa a través de la señalización Notch por la regulación al alza tanto de MMP-9 como MT1-MMP. Las Figuras 24A-B muestran el análisis de zimografía en gelatina de la actividad de MMP-9 y MMP-2 estimulada por VEGF en HUVEC. La Figura 24A muestra el efecto de N1ECDFc en la actividad de MMP-9. Se cultivaron HUVEC transducidas en gel de fibrina en el día indicado (es decir, D2, D4, D6, D8). También se obtuvieron resultados similares usando gel de colágeno, aunque la inducción de MMP-9 fue mayor en el gel de fibrina que en el gel de colágeno (datos no mostrados). La Figura 24B muestra el efecto de N1ECDFc en la actividad de MMP-2. Se transdujeron HUVEC con Ad-N1ECDFc a las dosis indicadas y se recogió el medio condicionado de HUVEC cultivadas en gel de colágeno en el día 4. Las Figuras 24C-D muestran la regulación al alza de MMP-9 y MT1-MMP con señalización Notch. Se transdujeron HUVEC bien con Ad-LacZ o Ad-N11C a 40 MOI. Los números muestran los ciclos de PCR. La Figura 24C muestra el análisis por RT-PCR del efecto de la señalización Notch en la expresión de MMP-9 y MMP-2. La Figura 24D muestra la inducción de la expresión de MT1-MMP tanto en el transcrito como la proteína con señalización Notch. La Figura 24E muestra el análisis por RT-PCR de la expresión de MMP-9 y MT1-MMP en ad-VEGF-HUVEC con co-transducción de Ad-N1ECDFc. Se transdujeron HUVEC con Ad-VEGF en ausencia o presencia de co-transducción con Ad-N1ECDFc a 40 MOI cada uno. Se co-transdujo Ad-LacZ para conseguir la misma cantidad total de adenovirus a 80 MOI.

#### Figuras 25A-25D

Estas Figuras muestran el papel de la señalización Notch e la angiogénesis *in vivo* dependiente de VEGF. Las Figuras 25A-25D muestran la inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF con N1ECDFc en el ensayo DAS en ratón. Se muestran fotografías representativas. La Figura 25A muestra angiogénesis inducida subcutánea con transfectante 293/VEGF frente a 293/VEGF que también expresa el señuelo Notch (proteína de fusión basada en Notch) N1ECDFc. La Figura 25B muestra la cuantificación del grado de vascularización inducido por 293/VEGF en control, frente a 293 que expresan el señuelo Notch (proteína de fusión basada en Notch) N1ECDFc. La Figura 25C muestra la angiogénesis inducida subcutánea con células MDA-MB-231 infectadas con Ad-LacZ frente a células MDA-MB-231 infectadas con Ad-N1ECDFc (proteína de fusión basada en Notch). Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 producen VEGF (datos no mostrados). La Figura 25D muestra la cuantificación del grado de vascularización inducido por células MDA-MB-231 infectadas con Ad-LacZ frente a células MDA-MB-231 infectadas con Ad-N1ECDFc (proteína de fusión basada en Notch).

#### Figuras 26A y 26B

Estas Figuras muestran la proliferación de HUVEC transducidas con Ad-VEGF165. Se transdujeron HUVEC con Ad-VEGF165 a las dosificaciones indicadas. También se co-infectó Ad-LacZ para conseguir la misma cantidad total de adenovirus a una MOI de 40 pfu/célula. Se suspendieron HUVEC en SFM suplementado con 1% FBS y se plaquearon a 1 X 10<sup>4</sup> células/pocillo en placas multi-pocillo de 24 pocillos con 0,4 ml de medio. Después de 4 días, se determinó el número de células usando el kit CCK-8 y los resultados se indican como la proporción del número de células determinado respecto al número de células control, que se transdujeron con Ad-GFP a una MOI de 40 pfu/célula. La Figura 26A muestra el efecto de VEGF transducido en la proliferación. La Figura 26B muestra el efecto inhibitorio de SU5416. Se trataron HUVEC transducidas con Ad-VEGF con SU5416 a las dosificaciones indicadas.

#### Figuras 27A y 27B

Estas Figuras muestran la inducción de yemas HUVEC en gel de colágeno de tipo I. Se transdujeron HUVEC bien con Ad-VEGF165 o Ad-N11C a las dosificaciones indicadas. También se co-infectó Ad-LacZ para conseguir la misma cantidad total de adenovirus a una MOI de 40 pfu/célula. Se cultivaron HUVEC transducidas en gel de colágeno con medio completo. La cantidad de gemación se evaluó bajo microscopio en el día 7.

## Figuras 28A y 28B

Estas Figuras muestran el efecto de la alteración de la señalización Notch en la proliferación celular. Las células se transdujeron con los adenovirus indicados. También se co-infectó Ad-GFP para conseguir la misma cantidad total de adenovirus a una MOI de 60 pfu/célula. Después de 4 días, se determinó el número de células usando el kit CCK-8 y los resultados se indican como la proporción del número de células determinado respecto al número de células control, que se transdujeron con Ad-GFP a una MOI de 60 pfu/célula. La Figura 28A muestra el efecto de N11C y proteína de fusión Notch transducidas en la proliferación de HUVEC. Se suspendieron HUVEC transducidas en medio completo y se plaquearon a  $1 \times 10^4$  células/pocillo en placas multipocillo de 24 pocillos con 0,4 ml del medio indicado (□: Ad-N11C; ■: Ad-N11ECDFc). La Figura 28B muestra el efecto de la proteína de fusión Notch en la proliferación de transfectantes KP1/VEGF. Los transfectantes transducidos KP1/VEGF se suspendieron en medio RPMI 1640 y se plaquearon a  $2 \times 10^4$  células/pocillo en placas multipocillo de 24 pocillos con 0,5 ml de medio.

## Figura 29

Esta Figura muestra el análisis por RT-PCR de la inducción de la expresión de PIGF en HUVEC transducidas con Ad-N11C. Se infectaron HUVEC bien con Ad-LacZ o Ad-N11C a una MOI de 40 pfu/célula. El ARN total se aisló de HUVEC transducidas cultivadas en gel de colágeno durante 5 días con medio completo.

## Figuras 30A-30C

Estas Figuras muestran la inhibición de la gemación de HUVEC transducidas bien con Ad-N11C o Ad-VEGF con transfección de siARN de Flk-1. La Figura 30A muestra la reducción de la expresión del ARNm y proteína Flk-1 en Ad-VEGF-HUVEC con transfección de 200 pmoles de siARN de Flk-1. Ad-VEGF-HUVEC a una MOI de 40 pfu/célula se transfectaron con 200 pmoles de siARN control (CT) o de Flk-1. El ARN total se aisló 48 horas después de la transfección. Se recogió el lisado celular total de células desprovistas de suero con SFM durante 48 horas después de la transfección. Las Figuras 30B y 30C muestran el efecto inhibitorio de la transfección con siARN de Flk-1 en las yemas de HUVEC inducidas bien con VEGF o Notch. Se transfectó bien Ad-N11C o Ad-VEGF-HUVEC a una MOI de 40 pfu/célula con 200 pmoles de siARN como se indica y se cultivaron en gel de colágeno durante 5 días. La Figura 30B muestra el efecto de la transfección con siARN de Flk-1 en las yemas HUVEC (□: Ad-VEGF; ■: Ad-N11C). La Figura 30C muestra la cuantificación del efecto inhibitorio de la transfección con siARN de Flk-1.

## Figuras 31A y 31B

Estas Figuras muestran la inhibición de la gemación de HUVEC transducidas con Ad-N11C con tratamiento con el inhibidor de metaloproteinasas de la matriz GM6001. Bien Ad-LacZ o Ad-N11C-HUVEC a una MOI de 40 pfu/célula se cultivaron en gel de colágeno durante 5 días en ausencia o presencia de GM6001 a  $50 \mu\text{m}$ . La Figura 31A muestra el efecto de GM6001 en yemas HUVEC inducidas con Notch. La Figura 31B muestra la cuantificación del efecto inhibitorio de GM6001.

## Figura 32A, 32B y 32C:

Esta Figura muestra la secuencia de nucleótidos de longitud completa de Notch3 humano (SEQ ID NO:15), que consiste en ATG de inicio (nt 1) a parada (TGA; nt 6964). El péptido señal y los primeros 34 dominios de repeticiones semejantes a EGF están presentes en nt 1-4158 de esta secuencia. Los nucleótidos 1-4158 se utilizan para el diseño de las proteínas señuelo Notch3 humanas, descritas en la presente memoria. Los nucleótidos que engloban las repeticiones de EGF 1-34 están subrayados.

## Figura 33:

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos (aa) de longitud completa de Notch3 humano (SEQ ID NO:16), que consiste en aa 1 (M= metionina) a aa 2555 (K= lisina). El péptido señal y los primeros 34 dominios de repeticiones semejantes a EGF están presentes en aa 1-1386 de esta secuencia. Los aminoácidos 1-1386 se utilizan para el diseño de las proteínas señuelo Notch3 humanas, descritas en las secciones siguientes. Los aminoácidos que engloban las repeticiones de EGF 1-34 están subrayados.

## Figura 34

Esta Figura muestra la esquematización de dos proteínas señuelo Notch3 humanas, señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup> y señuelo h-sp<sup>HC</sup>-Notch3<sup>(1-34)</sup>.

## Figura 35

Esta Figura muestra la secuencia de nucleótidos de Fc humano utilizada para generar la etiqueta Fc en las proteínas señuelo Notch3 (SEQ ID NO: 17). Los 713 nucleótidos de Fc humano se fusionan en el extremo 3' de la construcción señuelo Notch3, justo aguas abajo de las repeticiones semejantes a EGF de Notch3. Esta región de Fc humano permite la detección y purificación de los señuelos Notch y sirve para estabilizar las proteínas de fusión secretadas Notch3 humana-Fc humana.

Figura 36

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos de Fc humano utilizada para generar la etiqueta Fc en las proteínas señuelo Notch3 (SEQ ID NO: 18). Los 237 aminoácidos de Fc humano se fusionaron en el extremo C de todas las construcciones señuelo Notch3, justo aguas abajo de las repeticiones semejantes a EGF de Notch3. Esta región de Fc humano permite la detección y purificación de los señuelos Notch y sirve para estabilizar las proteínas de fusión secretadas Notch3 humana-Fc humana.

Figura 37:

Esta Figura muestra la secuencia de la fusión Notch3/Fc humana para todas las construcciones que finalizan después de la repetición 34 de EGF de Notch3 humana.

Figura 38

Esta Figura muestra el análisis de la secuencia señal del péptido señal de Notch3 humano que se predice que engloba los aminoácidos 1-40 de Notch3 humano. Esta determinación se hizo usando el programa SignalP 3.0 Server proporcionado por la Technical University de Dinamarca. Estos resultados predicen un sitio principal de escisión localizado entre alanina 39 (A39) y alanina 40 (A40). El sitio de escisión está indicado por "/" en la secuencia de aminoácidos 1-40 de Notch3 humano como se representa en esta figura.

Figura 39:

Esta Figura muestra el análisis de la secuencia señal del péptido señal de HC humano que se predice que engloba los aminoácidos 1-22 de HC humano. Esta determinación se hizo usando el programa SignalP 3.0 Server proporcionado por la Technical University de Dinamarca. Estos resultados predicen un sitio principal de escisión localizado entre alanina 21 (A21) y arginina 22 (A22). El sitio de escisión está indicado por "/" en la secuencia de aminoácidos 1-22 de HC humano proporcionado anteriormente.

Figura 40A y 40B:

Esta Figura muestra la secuencia de nucleótidos de la proteína señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup> (SEQ ID NO: 31). El péptido señal de Notch3 humano predicho está subrayado (nt 1-120). Las repeticiones 1-34 de EGF de Notch3 están codificadas desde nt 121-4158. La unión de fusión, sitio BgIII, está localizada en el nt 4158-4163. La secuencia etiqueta Fc está subrayada y en itálica.

Figura 41

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup> (SEQ ID NO: 32). El péptido señal de Notch3 humano predicho está subrayado (AA 1-40). Las repeticiones 1-34 de EGF de Notch3 están codificadas desde aa 41-1386. La secuencia etiqueta Fc está subrayada y en itálica.

Figura 42

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína señuelo h-sp<sup>HC</sup>Notch3<sup>(1-34)</sup> (SEQ ID NO: 33). El péptido señal de Notch3 humano predicho está subrayado (AA 1-22). Las repeticiones 1-34 de EGF de Notch3 están codificadas desde aa 22-1386. La secuencia etiqueta Fc está subrayada y en itálica.

Figura 43A y 43B

Esta Figura muestra la secuencia de nucleótidos de la proteína señuelo h-sp<sup>HC</sup>Notch3<sup>(1-34)</sup> (SEQ ID NO: 34). El péptido señal de HC humano predicho está subrayado (nt 1-66). Las repeticiones de EGF de Notch3 están codificadas desde nt 67-4104. La unión de fusión, sitio BgIII, es de nt 5004 a 5009. La secuencia etiqueta Fc está subrayada y en itálica.

Figura 44

Esta Figura muestra la expresión de proteínas y ligandos Notch en células endoteliales sanguíneas y linfáticas. Se llevó a cabo RT-PCR para Notch1-4, D114, D114 y Jagged1 en ARN aislado de células endoteliales sanguíneas (BEC) y células endoteliales linfáticas (LEC) purificadas de HMVEC. Notch1, Notch2, Notch4, D114 y Jagged1 se expresaron tanto en BEC como LEC a un nivel similar. La expresión de Notch3 parece estar restringida a LEC lo que sugiere que la señalización de Notch3 funciona en el endotelio linfático.

Figura 45

Esta Figura muestra que Notch3 se co-expresa con el marcador de células endoteliales linfáticas LYVE-1 y Prox1 en embriones e13.5. Se inmunotñieron secciones seriadas de 10 micrómetros de embriones de ratón de 13.5 días embrionarios bien para LYVE-1, Prox1 y Notch3. Notch3 se expresaba en las células que también expresaban los marcadores de células endoteliales linfáticas, LYVE-1 y Prox1.

Figura 46

Esta Figura muestra que Prox1 induce la expresión de Notch3 en células endoteliales sanguíneas. (A) Se examinó si la expresión ectópica de Prox1 alteraría la expresión de proteínas o ligandos Notch. Veinticuatro horas después de la infección adenoviral bien con Ad-Prox1 o Ad-LacZ, se aisló el ARN total de HUVEC y se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para Notch1-4, D114 y Jagged1. Prox1 reguló al alza de manera robusta la expresión de Notch3. La expresión de Notch1, Notch2, Notch4, D114 y Jagged1 no se vio afectada significativamente. (B) El compuesto E (cE), inhibidor de presenilina que inhibe la señalización de Notch, se incubó durante 24 horas en HUVEC infectadas bien con Ad-LacZ o Ad-Prox1. Se aisló el ARN total y se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para determinar la expresión de Notch3. Prox1 indujo la expresión de Notch3 y esta inducción se inhibió por la adición del compuesto E. Esto sugiere que la inducción por Prox1 de Notch3 depende de la activación de la señal Notch.

Figura 47

Esta Figura muestra que Prox1 induce genes diana de Notch en células endoteliales sanguíneas. Se infectaron HUVEC con adenovirus que codifican, LacZ, Prox1, N1IC o N4/int-3 y se aisló el ARN total 24 horas después de la infección. Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para los genes diana de Notch endoteliales, VEGFR-3, EfrinaB2, Hey1 y Hey2. De manera similar a la activación de la señal de Notch1 y Notch4, Prox1 indujo los cuatro genes (A y B). Se desconoce la expresión de Hey1 y Hey2 en el endotelio linfático.

Figura 48

Esta Figura muestra que Prox1 induce genes diana de Notch de manera dependiente de la señalización de Notch en células endoteliales sanguíneas. Se infectaron HUVEC con adenovirus que codifican, LacZ, Prox1, N1IC o N4/int-3. El compuesto E (cE), inhibidor de presenilina que inhibe la señalización de Notch, se incubó durante 24 horas en HUVEC infectadas bien con Ad-LacZ o Ad-Prox1 y se aisló el ARN total. Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para los genes diana de Notch endoteliales, VEGFR-3, EfrinaB2 y Hey2. La inducción mediada por Prox1 de los genes diana de Notch, EfrinaB2, VEGFR-3 y Hey2 se inhibió por la adición del inhibidor de la señalización de Notch, Compuesto E. Así, Prox1 regula la expresión de EfrinaB2, VEGFR-3 y Hey2 a través de Notch.

Figura 49

Esta Figura muestra un esquema de la activación génica de N1IC. Se insertó una forma activada de Notch1 en el locus EF1alfa flanqueado por dos sitios LoxP. Después de la expresión de la recombinasa Cre, el casete neo/tpA se pierde y N1IC se expresa bajo el control del promotor ubicuo EF1 alfa.

Figura 50:

Esta Figura muestra que la activación de Notch en células de músculo liso vascular que expresan SM22 resulta en letalidad embrionaria antes de E10.5. No se observaron ratones SM22Cre/+; EF1αN1IC/ viables en el día postnatal 21 (P21) con un valor de p menor de 0,001. En el día embrionario E9.5, se observó un número predicho de embriones SM22Cre/+; EF1αN1IC/+, pero tenían un retraso grave en el crecimiento comparado con sus compañeros de camada control (Panel inferior).

Figura 51:

Esta Figura muestra que la activación de Notch en células de músculo liso vascular que expresan SM22 altera la expresión de actina alfa en células de músculo liso. Los embriones E9.5 se inmunotifieron íntegramente para actina alfa de células de músculo liso. La expresión de actina alfa de células de músculo liso se alteró en los embriones SM22Cre/+; EF1αN1IC/+ comparado con los controles WT. Así, la activación de la señal Notch en las células de músculo liso vascular interrumpe el desarrollo cardiovascular.

**Descripción detallada de la invención**

Términos

Tal y como se usa en esta descripción, excepto cuando se proporciona expresamente de otra forma en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes tendrá el significado mostrado a continuación.

"Administrar" puede efectuarse o llevarse a cabo usando cualquiera de los métodos conocidos para un experto en la técnica. Los métodos comprenden, por ejemplo, medios de administración intralesional, intramuscular, subcutáneo, intravenoso, intraperitoneal, mediado por liposomas, transmucosal, intestinal, tópico, nasal, oral, anal, ocular u ótico.

"Fijado" significará unido por cualquier medio. En una realización, fijado significa unido por un enlace covalente. En otra realización, fijado significa unido no covalentemente.

"Aminoácido", "residuo de aminoácido" y "residuo" se usan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a un aminoácido que está incorporado en una proteína, polipéptido o péptido. El aminoácido puede ser,

por ejemplo, un aminoácido natural o un análogo de un aminoácido natural que puede funcionar de una manera similar a la del aminoácido natural.

"Anticuerpo" incluirá, sin limitación, (a) una molécula de inmunoglobulina que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras y que reconoce un antígeno; (b) una molécula de inmunoglobulina policlonal o monoclonal; y (c) un fragmento monovalente o divalente de ésta. Las moléculas de inmunoglobulina puede derivar de cualquiera de las clases comúnmente conocidas, incluyendo pero no limitado a IgA, IgA secretora, IgG, IgE e IgM. Las subclases de IgG son muy conocidas para los expertos en la técnica e incluyen, pero no están limitadas a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. Los anticuerpos pueden ser tanto naturales como no naturales. Además, los anticuerpos incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente sintéticos, anticuerpos de cadena única, y fragmentos de éstos. Los anticuerpos pueden ser humanos o no humanos. Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse por métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en los seres humanos. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, sin limitación, fragmentos Fab y F<sub>c</sub>. La "parte Fc de un anticuerpo", en una realización, es un fragmento cristizable obtenido por digestión con papaína de inmunoglobulina que consiste en la mitad C terminal de dos cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro y conocida como la "región efectora" de la inmunoglobulina. En otra realización, la "parte Fc de un anticuerpo" significa toda, o sustancialmente toda, de una mitad C terminal de una cadena pesada.

"Humanizado", respecto a un anticuerpo, significa un anticuerpo en el que parte, la mayor parte o todos los aminoácidos fuera de la región CDR se reemplazan con los aminoácidos correspondientes derivados de una molécula de inmunoglobulina humana. Son permisibles pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no supriman la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humanas adecuadas incluyen, sin limitación, moléculas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Varias publicaciones describen cómo preparar anticuerpos humanizados, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, y la Publicación PCT Internacional No. WO 90/07861.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "composición", como en composición farmacéutica, se pretende que englobe un producto que comprende el o los ingredientes activos y el o los ingredientes inertes para preparar el vehículo, así como cualquier producto que resulta, directamente o indirectamente de la combinación formación de complejos, o agregación de dos cualesquiera o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes.

Tal y como se usa en la presente memoria, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que es capaz de tratar a un sujeto que tiene un tumor, una enfermedad o un trastorno. De acuerdo con esto, la cantidad efectiva variará con el sujeto que se está tratando, así como la afección que se va a tratar. Un experto en la técnica puede llevar a cabo experimentos rutinarios de titulación para determinar dicha cantidad suficiente. La cantidad efectiva de un compuesto variará dependiendo del sujeto y de la ruta particular de administración usada. Tomando como base el compuesto, la cantidad puede administrarse continuamente, tal como por una bomba continua, o a intervalos periódicos (por ejemplo, en una o más ocasiones separadas). Un experto en la técnica puede determinar los intervalos de tiempo deseados de múltiples cantidades de un compuesto particular sin experimentación innecesaria. En una realización, la cantidad efectiva es entre aproximadamente 1 µg/kg-10 mg/kg. En otra realización, la cantidad efectiva es entre aproximadamente 10 µg/kg-1 mg/kg. En una realización adicional, la cantidad efectiva es 100 µg/kg.

"Dominio extracelular" tal y como se usa en conexión con la proteína receptora Notch significa todo o una parte de Notch que (i) existe extracelularmente (es decir, no existe ni como parte transmembrana ni como parte intracelular) y (ii) se une a ligandos extracelulares a los que se une la proteína receptora Notch intacta. El dominio extracelular de Notch puede incluir opcionalmente un péptido señal. "Dominio extracelular", "ECD" y "Ectodominio" son sinónimos.

"Resto que incrementa la vida media" significa un resto que, cuando se fija de forma operativa a un segundo resto, incrementa la vida media in vivo del segundo resto. Los restos que incrementan la vida media incluyen, por ejemplo, partes Fc de anticuerpos, etiquetas de glicosilación (es decir, polipéptidos glicosilados), polietileno glicol (PEG), polipéptidos que tienen PEG fijado a ellos, y polipéptidos modificados con lípidos.

"Inhibir" el inicio de un trastorno o proceso biológico no deseado significará bien disminuir la probabilidad del inicio del trastorno o proceso, o prevenir el inicio del trastorno o proceso completamente. En la realización preferida, inhibir el inicio de un trastorno o proceso significa prevenir su inicio totalmente.

"Notch", "proteína Notch", y "proteína receptora Notch" son sinónimos. Además, los términos "proteína de fusión basada en Notch" y "señuelo Notch" son sinónimos. Se conocen las secuencias de aminoácidos de Notch siguientes:

Notch1 (no. de registro Genbank S18188 (rata)); Notch2 (no. de registro Genbank NP\_077334 (rata)); Notch3 (no. de registro Genbank Q61982 (ratón)); y Notch4 (no. de registro Genbank T09059 (ratón)). Se conocen las secuencias de ácido nucleico de Notch siguientes:

Notch1 (no. de registro Genbank XM\_342392 (rata) y NM\_017617 (humano)); Notch2 (no. de registro Genbank NM\_024358 (rata), M99437 (humano) y AF308601 (humano)); Notch3 (no. de registro Genbank NM\_008716 (ratón) y XM\_009303 (humano)); y Notch4 (no. de registro Genbank NM\_010929 (ratón) y NM\_004557 (humano)).

5 Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "secuencia de ácido nucleico" se usan indistintamente en la presente memoria, y cada uno se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos. Los desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos pueden ser naturales o análogos sintéticos de éstos. "Ácido nucleico" significará cualquier ácido nucleico, incluyendo, sin limitación, ADN, ARN e híbridos de éstos. Las bases de ácido nucleico que forman moléculas de ácido nucleico pueden ser las bases A, C, G, T y U, así como derivados de éstas. Los derivados de estas bases son muy conocidos en la técnica, y se ejemplifican en PCR Systems, Reagents and Consumables (Perkin Elmer Catálogo 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, Nueva Jersey, EEUU). Los ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, moléculas anti-sentido y moléculas de ácido nucleico catalíticas tales como ribozimas y ADNzimas. Los ácidos nucleicos también incluyen ácido nucleicos que codifican análogos de péptido, fragmentos o derivados que se diferencian de las formas naturales en términos de la identidad de uno o más residuos de aminoácidos (análogos de delección que contienen menos de todos los residuos especificados; análogos de sustitución en los que uno o más residuos se reemplazan por uno o más residuos; y análogos de adición, en los que uno o más residuos se añaden a una parte terminal o mediana del péptido) que comparten parte o todas las propiedades de las formas naturales.

"Fijado de forma operativa" significa, respecto a un primer resto fijado a un segundo resto, fijado de una manera que permite al primer resto funcionar (por ejemplo, propiedades de unión) como si no estuviera fijado.

20 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria, y cada uno significa un polímero de residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos pueden ser naturales o análogos químicos de éstos. Los polipéptidos, péptidos y proteínas también pueden incluir modificaciones tales como glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, hidroxilación y ADP-ribosilación.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo es compatible con los demás ingredientes de la formulación y que no es perjudicial para el receptor de éstos, y engloba cualquiera de los vehículos estándar farmacéuticamente aceptados. Dichos vehículos incluyen, por ejemplo, 0,01-0.1 M y preferiblemente 0,05 M tampón fosfato ó 0,8% disolución salina. Además, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propileno glicol, polietileno glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones y suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactosa y aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y semejantes. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, y semejantes.

"Sujeto" significará cualquier organismo incluyendo, sin limitación, un mamífero tal como un ratón, una rata, un perro, una cobaya, un hurón, un conejo y un primate. En la realización preferida, el sujeto es un ser humano.

40 "Tratar" significará ralentizar, parar o revertir la progresión de una enfermedad o trastorno. Tal y como se usa en la presente memoria, "tratar" también significa la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno. Las enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, Angiogénesis Tumoral, Aterosclerosis, Cicatrización de Heridas, Degeneración macular, Retinopatía de los Prematuros, Pre-eclampsia, Retinopatía diabética, Isquemia, Ictus, Enfermedad Cardiovascular y Psoriasis.

45 La angiogénesis se produce durante los procesos de cicatrización de heridas, el ciclo menstrual femenino y el remodelado endometrial, así como durante el desarrollo embrionario y el crecimiento de los órganos. En el entorno patológico, la angiogénesis juega un papel importante en diferentes enfermedades como artritis reumatoide, psoriasis, degeneración macular, retinopatía diabética, y crecimiento tumoral.

50 Ha habido una evidencia considerable *in vivo*, incluyendo observaciones clínicas, de que la angiogénesis anormal está implicada en varias afecciones patológicas, que incluyen artritis reumatoide, inflamación, cáncer, psoriasis, afecciones oculares degenerativas y otras.

55 Las unidades, prefijos y símbolos pueden indicarse en su forma aceptada por el SI. A no ser que se indique otra cosa, las secuencias de ácido nucleico se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3' y las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi terminal. Los aminoácidos pueden referirse en la presente memoria bien por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, asimismo, pueden referirse por sus códigos de una letra comúnmente aceptados.

En la presente memoria se usan las abreviaturas siguientes: ECD: dominio extracelular; IC: dominio intracelular; NECD/Fc: proteína de fusión basada en Notch; N1: Notch1; N2: Notch2; N3: Notch3; N4: Notch4; D11: semejante a

Delta; EC: células endoteliales; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos; HUVEC: célula endotelial de la vena umbilical humana; m.o.i.: multiplicidad de infección; VMC: células murales vasculares; VEGF: factor de crecimiento de las células del endotelio vascular; VEGFR: receptor del factor de crecimiento de las células del endotelio vascular; sp: péptido señal; HC o Hc: Cadena pesada de IgG; PDGF; factor de crecimiento derivado de plaquetas; PIGF: factor de crecimiento placentario;

5

Realizaciones de la invención

Esta descripción se refiere generalmente a una proteína de fusión que comprende un péptido señal, repeticiones de EGF 1-X del dominio extracelular de la proteína receptora Notch3 humana en el que X es cualquier número entero de 12 a 34, y una parte Fc de un anticuerpo unida a éste.

10 Esta descripción describe una proteína de fusión que comprende un péptido señal, repeticiones de EGF 1-X del dominio extracelular de la proteína receptora Notch3 humana en el que X es cualquier número entero de 1 a 10, y una parte Fc de un anticuerpo unida a éste.

Esta descripción describe una proteína de fusión que comprende un péptido señal, al menos 12 repeticiones de EGF del dominio extracelular del receptor Notch3 humano, y una parte Fc de un anticuerpo unida a éste.

15 Esta descripción describe una proteína de fusión que comprende un péptido señal, repeticiones de EGF del dominio extracelular de la proteína receptora Notch3 humana, en el que están presentes al menos 12 repeticiones de EGF, y una parte Fc de un anticuerpo unida a éste.

En una realización de la proteína de fusión, el dominio extracelular de la proteína receptora Notch3 comprende repeticiones semejantes a EGF 1-34.

20 En una realización de la proteína de fusión, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano.

En una realización de la proteína de fusión, el péptido señal es el péptido señal de Notch3 o la parte Hc (HC; Cadena Pesada) de un anticuerpo.

25 En una realización, la proteína de fusión comprende aminoácidos consecutivos, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 32. En otra realización, la proteína de fusión comprende aminoácidos consecutivos, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 33.

En una realización, la proteína de fusión está codificada por nucleótidos consecutivos, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 31. En otra realización, la proteína de fusión está codificada por nucleótidos consecutivos, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 34.

30 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para tratar un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para tratar al sujeto, tratando de esta manera al sujeto que tiene un tumor.

35 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir la angiogénesis en el sujeto, inhibiendo de esta manera la angiogénesis en el sujeto.

Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para tratar cáncer de ovario en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para tratar al sujeto, tratando de esta manera al sujeto que tiene cáncer de ovario.

40 Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad cardiovascular en un sujeto. En una realización, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, isquemia o ictus.

Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor en un sujeto.

45 Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la angiogénesis en un sujeto.

Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para tratar cáncer de ovario en un sujeto.

50 Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir la linfangiogénesis fisiológica o linfangiogénesis patológica en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir la linfangiogénesis fisiológica o linfangiogénesis patológica en el sujeto. En una realización, la linfangiogénesis patológica es

linfangiogénesis tumoral o metástasis en ganglios linfáticos que puede ser dependiente de la linfangiogénesis tumoral.

5 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir la metástasis tumoral en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir la metástasis tumoral en el sujeto. En una realización, la metástasis ocurre a través de un vaso sanguíneo, la vasculatura linfática o un ganglio linfático. La metástasis tumoral es la diseminación del cáncer de un órgano a otro órgano no adyacente.

10 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor secundario en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir el crecimiento del tumor secundario en el sujeto. La inhibición también puede ser de la angiogénesis tumoral asociada con el tumor secundario o metastásico. En otra realización, el crecimiento del tumor secundario se inhibe por la inhibición de la angiogénesis asociada con el tumor secundario.

15 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para inhibir la coopción de los vasos sanguíneos por un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para inhibir la coopción de los vasos sanguíneos por un tumor en el sujeto. El proceso de coopción de los vasos es un proceso mediante el cual las células tumorales se asocian con vasos pre-existentes y crecen con la ayuda de los vasos que experimentan coopción. Este crecimiento de tumores en vasos que experimentan coopción puede ser en ausencia de, preceder, o estar en conjunción con la angiogénesis tumoral. Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto. En una realización, el inhibidor de VEGF es un inhibidor de VEGF-A, un inhibidor de PGIF, un inhibidor de VEGF-B, un inhibidor de VEGF-C, o un inhibidor de VEGF-D. Los ejemplos de inhibidores de VEGF incluyen, pero no están limitados a, bevacizumab, PTK787, Bay43-9006, SU11248, AG013676, ZD6474, trampa de VEGF y Anti-VEGFR2. Los ejemplos de dichos inhibidores se describen completamente en Ferrara et al., (2004) Nature Reviews Drug Discovery, Vol. 3: 391-400 y Ellis et al. (2008) Nature Reviews Cancer Vol. 8: 579-591.

30 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del receptor de VEGF para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del receptor de VEGF, cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto. En una realización, el inhibidor del receptor de VEGF es un inhibidor de VEGFR-1, un inhibidor de VEGFR-2, un inhibidor de VEGFR-3 o un inhibidor de cualquier combinación de VEGFR. Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto. En una realización, el inhibidor de los Factores de Crecimiento Derivados de Plaquetas es un inhibidor de PDGF-A o un inhibidor de PDGF-B.

40 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un antagonista del receptor de PDGF para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un antagonista del receptor de PDGF, cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto. En una realización, el antagonista del receptor de PDGF es un antagonista del receptor PDGF B.

45 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor de HER2/neu para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión descrita en la presente memoria y un inhibidor de HER2/neu, cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el sujeto.

50 Esta descripción describe la proteína de fusión descrita en la presente memoria para uso en un método para tratar cáncer de mama en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente memoria efectiva para tratar el cáncer de mama en el sujeto.

Esta descripción describe el uso de la proteína de fusión descrita en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para tratar cáncer de mama en un sujeto.

55 Esta descripción describe una composición de materia que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media para uso en un primer método para tratar un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición de materia que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media, de forma que de esta manera se trata al sujeto.

5 Esta descripción describe una composición de materia que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media para uso en un segundo método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición de materia que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media, de forma que de esta manera se inhibe la angiogénesis en el sujeto.

10 En una primera realización de los métodos anteriores, la proteína receptora Notch es una proteína receptora Notch1. En una realización, la proteína receptora Notch1 es una proteína receptora Notch1 humana. En otra realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano. En una realización adicional, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

15 En una segunda realización de los métodos anteriores, la proteína receptora Notch es una proteína receptora Notch2. En una realización, la proteína receptora Notch2 es una proteína receptora Notch2 humana. En otra realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano. En una realización adicional, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

20 En una tercera realización de los métodos anteriores, la proteína receptora Notch es una proteína receptora Notch3. En una realización, la proteína receptora Notch3 es una proteína receptora Notch3 humana. En otra realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano. En una realización adicional, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

25 En una cuarta realización de los métodos anteriores, la proteína receptora Notch es una proteína receptora Notch4. En una realización, la proteína receptora Notch4 es una proteína receptora Notch4 humana. En otra realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano. En una realización adicional, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

En una quinta realización de los métodos anteriores, el sujeto es un mamífero. En una realización, el mamífero es un ser humano.

En una sexta realización de los métodos anteriores, la angiogénesis es angiogénesis tumoral.

30 En una realización adicional del segundo método, el sujeto tiene un tumor. En otra realización, el sujeto padece una hiperplasia vascular patológica. En una realización, la hiperplasia vascular patológica es un hemangioma benigno. En una realización adicional, el sujeto padece una enfermedad proliferativa vascular linfática.

35 Esta descripción describe una primera composición de materia que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch4 fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media. En una realización, el dominio extracelular está unido covalentemente al resto que incrementa la vida media. En otra realización, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

Esta descripción describe una segunda composición de materia que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch4 fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Esta descripción describe un artículo de fabricación que comprende (i) un material de envasado que tiene en él una composición de materia que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media y (ii) una etiqueta que indica que la composición se pretende para uso en un método para tratar un tumor en un sujeto u otro trastorno tratable mediante la inhibición de la angiogénesis en el sujeto.

45 En una primera realización del artículo anterior, la proteína receptora Notch es una proteína receptora Notch1. En una realización, la proteína receptora Notch1 es una proteína receptora Notch1 humana. En otra realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano. En una realización adicional, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

50 En una segunda realización del artículo anterior, la proteína receptora Notch es una proteína receptora Notch2. En una realización, la proteína receptora Notch2 es una proteína receptora Notch2 humana. En otra realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano. En una realización adicional, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

5 En una tercera realización del artículo anterior, la proteína receptora Notch es una proteína receptora Notch3. En una realización, la proteína receptora Notch3 es una proteína receptora Notch3 humana. En otra realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano. En una realización adicional, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

10 En una cuarta realización del artículo anterior, la proteína receptora Notch es una proteína receptora Notch4. En una realización, la proteína receptora Notch4 es una proteína receptora Notch4 humana. En otra realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano. En una realización adicional, el dominio extracelular y el resto que incrementa la vida media están en la misma cadena polipeptídica.

En otra realización del artículo anterior, la composición se mezcla con un vehículo farmacéutico. En una realización final, el sujeto es un ser humano.

15 Esta descripción describe un vector replicable que codifica un polipéptido que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch3 fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media. En una realización, el resto que incrementa la vida media es una parte Fc de un anticuerpo. En otra realización, el vector incluye, sin limitación, un plásmido, un cósmido, un retrovirus, un adenovirus, un fago lambda o un YAC.

20 Esta descripción también se refiere a un sistema de huésped vector que comprende un vector replicable que codifica un polipéptido que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media y una célula huésped adecuada. En una realización, la célula huésped es una célula eucariota. En otra realización, la célula eucariota es una célula CHO. En otra realización, la célula eucariota es una célula HeLa. En una realización adicional, la célula huésped es una célula bacteriana.

25 Finalmente, esta descripción describe un tercer método para producir un polipéptido que comprende crecer un sistema huésped vector que comprende un vector replicable que codifica un polipéptido que comprende el dominio extracelular de una proteína receptora Notch fijado de forma operativa a un resto que incrementa la vida media y una célula huésped adecuada en condiciones que permitan la producción del polipéptido, y recuperar el polipéptido así producido.

La invención se ilustra en la sección de Detalles Experimentales que sigue. Esta sección se muestra para ayudar en la comprensión de la invención.

### Detalles experimentales

#### 30 Primera serie de experimentos

##### *Proteínas de fusión Notch3 humanas (señuelos Notch)*

35 Los señuelos Notch3 se ensamblan usando secuencias que codifican un péptido señal, una parte del dominio extracelular de Notch3 que engloba todos los dominios de repetición semejantes a EGF, y una parte de la región Fc humana (aminoácidos 1-237). La secuencia de nucleótidos completa de longitud completa de Notch3 humano se proporciona en la Figura 32. La secuencia de aminoácidos completa de longitud completa de Notch3 humano se proporciona en la Figura 33.

Los péptidos señal utilizados son bien el péptido señal nativo de Notch3 o el péptido señal de Hc humano, cada uno fusionado a una región de Notch3. El péptido señal permite la secreción de las proteínas señuelo Notch.

40 Los dominios extracelulares de Notch3 usados se diseñan para unirse a los ligandos Notch y consisten en todo o un subconjunto de los 34 dominios de repetición semejante a EGF de la proteína Notch humana.

La etiqueta Fc se fusiona al extremo C de una repetición semejante a EGF dada de Notch3 humano y sirve para permitir la purificación, detección, y estabilización de las proteínas señuelo Notch3.

45 El diseño global de los señuelos Notch3 humanos, dos formulaciones, es para codificar; (1) un péptido señal para permitir la secreción de las proteínas señuelo Notch3 en el medio extracelular de células eucariotas que se usan para producir las proteínas, (2) una parte del dominio extracelular de todas las repeticiones semejantes a EGF de Notch3 humano para permitir la asociación con ligandos Notch, y (3) una parte de la proteína Fc humana para permitir la detección.

Se describirán las dos formulaciones siguientes de señuelos Notch3 humanos y se esquematizan en la Figura 34.

1) Señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup>

50 2) Señuelo h-sp<sup>HC</sup>Notch3<sup>(1-34)</sup>

*Secuencia de Notch3 humano*

La secuencia de nucleótidos (nt) de longitud completa de Notch3 humano, que consiste en ATG de inicio (nt 1) hasta la parada (TGA; nt 6964) se muestra en la Figura 32. El péptido señal y los primeros 34 dominios de repetición semejantes a EGF están presentes en nt 1-4158 de esta secuencia. Los nucleótidos 1-4158 se utilizan para el diseño de las proteínas señuelo Notch3 humanas, descritas en las secciones siguientes. Los nucleótidos que engloban las repeticiones 1-34 de EGF están subrayados.

La secuencia de aminoácidos (aa) de longitud completa de Notch3 humano, que consiste en aa 1 (M= metionina) hasta aa 2555 (K= lisina) se muestra en la Figura 33. El péptido señal y los primeros 34 dominios de repetición semejantes a EGF están presentes en aa 1-1386 de esta secuencia. Los aminoácidos 1-1386 se utilizan para el diseño de las proteínas señuelo Notch3 humanas, descritas en las secciones siguientes. Los aminoácidos que engloban las repeticiones 1-34 de EGF están subrayados.

*Secuencia de Fc humano utilizado para generar la etiqueta Fc en las proteínas señuelo Notch3*

Los 713 nucleótidos de Fc humano, que se muestran en la Figura 35, se fusionan en el extremo 3' de la construcción señuelo Notch3, justo aguas abajo de las repeticiones de Notch3 semejantes a EGF. Esta región de Fc humano permite la detección y purificación de los señuelos Notch y sirve para estabilizar las proteínas de fusión secretadas Notch3 humano-Fc humano.

Los 237 aminoácidos de Fc humano, mostrados en la Figura 36, se fusionan en el extremo C de todas las construcciones señuelo Notch3, justo aguas abajo de las repeticiones de Notch3 semejantes a EGF. Esta región de Fc humano permite la detección y purificación de los señuelos Notch y sirve para estabilizar las proteínas de fusión secretadas Notch3 humano-Fc humano.

*Péptidos señal utilizados en las proteínas señuelo Notch3*

Dos secuencias de péptido señal distintas se incorporaron en el diseño de las proteínas señuelo Notch1 humanas. La primera es el péptido señal de Notch3 humano que se predice que engloba los aminoácidos 1-40 de Notch3 humano.

Esta determinación se hizo usando el programa Signal IP 3.0 Server proporcionado por la Technical University de Dinamarca. La segunda es el péptido señal de Hc humano que se predice que engloba los aminoácidos 1-22 del péptido señal de la cadena pesada (HC) de IgG humana.

*1. Péptido señal de Notch3 humano (nt 1-20)*

**MGPARGRRRRRRRPMSPPPPPPPVRLPLLLLLAGPGA/A (SEQ ID NO:27)**

La secuencia de aminoácidos del péptido señal predicho Notch3 humano se esquematiza en la Figura 37. Los resultados de la predicción del análisis utilizando el SignalIP 3.0 Server proporcionado en línea por la Technical University de Dinamarca se muestran en la Figura 37. Estos resultados predicen un sitio de escisión principal localizado entre la alanina 39 (A39) y alanina 40 (A40). Este sitio de escisión se indica por "/" en la secuencia de aminoácidos 1-40 de Notch3 humano, proporcionada anteriormente.

*2. Péptido señal de HC humano (aa 1-22)*

La secuencia de aminoácidos del péptido señal predicho de Hc humano es

**MWGWKCLLFWAVLVTATLCTA/R (SEQ ID NO: 29)**

La secuencia de nucleótidos del péptido señal predicho de Hc humano es:

Los resultados de la predicción del análisis utilizando el SignalIP 3.0 Server proporcionado en línea por la Technical University de Dinamarca se muestran anteriormente. Estos resultados predicen un sitio de escisión principal localizado entre la alanina 21 (A21) y arginina 22 (22). Este sitio de escisión se indica por "/" en la secuencia de aminoácidos 1-22 de Hc humano proporcionada anteriormente.

*Señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup>*

El señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup> indica el señuelo Notch3 humano que engloba las repeticiones 1-34 semejantes a EGF de Notch3.

La secuencia de aminoácidos de la proteína señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup> se muestra en la Figura 41. El péptido señal predicho de Notch3 humano está subrayado (AA 1-40). Las repeticiones 1-34 de EGF de Notch3 están codificadas desde aa 41-1386. La secuencia de la etiqueta Fc está subrayada y en itálica.

La secuencia de nucleótidos de la proteína señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup> se muestra en la Figura 40. El péptido señal predicho de Notch3 humano está subrayado (nt 1-120). Las repeticiones 1-34 de EGF de Notch3 están codificadas desde nt 121-4158. La unión de fusión, sitio BgIII, es nt 4158 a 4163. La secuencia de la etiqueta Fc está subrayada y en itálica.

#### 5 Señuelo h-sp<sup>Hc</sup>Notch1<sup>(1-34)</sup>

El señuelo h-sp<sup>Hc</sup>Notch1<sup>(1-34)</sup> indica el señuelo Notch3 humano que engloba las repeticiones 1-34 semejantes a EGF. La abreviatura sp<sup>Hc</sup> indica que se usa el péptido señal de Hc humano en esta formulación.

10 La secuencia de aminoácidos de la proteína señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup> se muestra en la Figura 42. El péptido señal predicho de Hc humano está subrayado (AA 1-22). Las repeticiones 1-34 de EGF de Notch3 están codificadas desde aa 22-1386. La secuencia de la etiqueta Fc está subrayada y en itálica.

La secuencia de nucleótidos de la proteína señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup> se muestra en la Figura 43. El péptido señal predicho de Hc humano está subrayado (nt 1-66). Las repeticiones 1-34 de EGF de Notch3 están codificadas desde nt 67-4104. La unión de fusión, sitio BgIII, es nt 4104 a 4109. La secuencia de la etiqueta Fc está subrayada y en itálica.

#### 15 **Métodos**

##### *Construcción de señuelos Notch3 humanos*

20 Se usó el ARN total bien de células de músculo liso aórtico humano (AoSMC) o células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) que sobreexpresaban Prox1 para generar variantes señuelo Notch3 humanas. El ARN total se transcribió de forma inversa con la transcriptasa inversa M-MLV y bien cebadores hexaméricos aleatorios o cebadores específicos del señuelo Notch3. El ADNc sintetizado se amplificó con cebadores específicos del señuelo Notch3 aguas arriba (con sentido) y aguas baja (antisentido). El señuelo Notch3 se construyó a partir de 4 amplicones individuales. El amplicón 3' se amplificó con un cebador aguas abajo que codificaba un sitio de restricción BgIII en el extremo 5' para ligación en el sitio BgIII en la secuencia Fc para generar una quimera Notch3/Fc humana en marco.

25 En el caso de los señuelos Notch3 que generan la fusión después de la secuencia de nucleótidos que codifica la repetición 35 semejante a EGF, se generará un sitio BgIII para crear el sitio de fusión y se proporciona esta secuencia de fusión (Notch3, Figura 37). Esto se aplica a las formulaciones señuelo h-Notch3(1-34) y señuelo h-sp<sup>Hc</sup>Notch3 (1-34).

30 Los productos de PCR amplificados se subclonaron en pBluescript SK II Fc para generar las diferentes quimeras Notch3/Fc humanas. Las secuencias señuelo Notch3/Fc humanas se trasladan a vectores de expresión de mamíferos (pAd-lox, pCCL o pcDNA3) para la expresión y purificación de las proteínas señuelo Notch3 humanas.

#### **Segunda serie de experimentos**

##### **Materiales y métodos**

##### *Construcciones de plásmido*

35 Las construcciones de adenovirus que codifican LacZ, Notch4 de longitud completa, o la forma activada de Notch4/int3 se han descrito previamente (Shawber et al., 2003). Una forma activada de ADNc de Notch1 fusionado en marco con 6 etiquetas myc (Kopan et al., 1994) se clonó en el vector de expresión de adenovirus, pAd-lox. Tanto VEGF165 como N1ECDFc también se clonaron en el pAd-lox. Se generaron preparaciones madre de adenovirus y se titularon como se ha descrito previamente (Hardy et al., 1997). El vector de expresión retroviral pHyTc que codifica bien LacZ, la forma activada de Notch4/int3, J1, D111 y D114 se han descrito previamente (Uyttendaele et al., 2000, Shawber et al., 2003, Das et al., 2004 en prensa). Los plásmidos que codifican el dominio extracelular de Notch1 (pb 5479-7833, registro Genbank# X57405) y el dominio extracelular de D114 (pb 1-1545, registro Genbank# AF253468, proporcionado por Chiron) fusionados en marco con una etiqueta myc/His, se prepararon por ingeniería en pHyTC.

45 Notch1ECD, Notch2ECD, Notch3ECD y Notch4ECD se prepararon por ingeniería en el plásmido pCMX-sFR1-IgG que contiene Fc usando los métodos mostrados en Clin. Exp. Immunol. (1992) 87(1): 105-110 para crear las proteínas de fusión basadas en Notch, es decir, Notch1ECD/Fc, Notch2ECD/Fc, Notch3ECD/Fc y Notch4ECD/Fc.

##### *Transferencia génica adenoviral*

50 Se sembraron 7,5 X 10<sup>5</sup> células de HUVEC en el subcultivo 3 en placas de 6 pocillos recubiertas con colágeno de tipo I el día antes de la infección adenoviral. La infección adenoviral con Ad-lacZ, Ad-VEGF165 o Ad-N1ECDFc se llevó a cabo a las m.o.i. indicadas, y se incubó a 37°C durante 1 hr mezclando con movimientos circulares ocasionales de las placas.

*Ensayos informadores con luciferasa*

Para determinar la señalización Notch inducida por ligando, se llevaron a cabo ensayos de co-cultivo usando células HeLa y Bosc derivadas de 293. Se llevaron a cabo transfecciones transitorias por precipitación con fosfato de calcio. Las células HeLa plaqueadas 1 día antes en placas de 10 cm a  $1,5 \times 10^6$  se transfectaron con 333 ng de pBOS Notch1, 333 ng de pGA981-6, y 83 ng de pLNC lacZ bien con 666 ng de pCMV-Fc o pHyTC-N1ECDFc (333 ng para xl, 666 ng para x2). Las células Bosc plaqueadas 1 día antes en placas de 10 cm a  $4 \times 10^6$  se transfectaron bien con 680 ng de pHyTc-Jagged1, pHyTc-D111, pHyTc-D114 o pHyTc-x (vector vacío). Un día después de la transfección, las células se co-cultivaron en triplicado (HeLa:Bosc, 1:2) en placas de 12 pocillos durante 24 horas. Las células se recogieron y se determinó la actividad luciferasa 2 días después de la transfección usando el kit de ensayo Enhanced Luciferase (BD PharMingen), y se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa usando el kit Galacto-Light Plus (PE Biosystems). Todos los ensayos se llevaron a cabo en un luminómetro de inyección dual Berthold.

Para determinar la señalización Notch inducida por VEGF, se usaron HUVEC que se habían infectado con adenovirus. Se infectaron HUVEC plaqueadas 1 día antes en placas de 6 pocillos a  $8,0 \times 10^5$  bien con Ad-LacZ como control o Ad-VEGF a las m.o.i. indicadas en presencia o ausencia de Ad-N1ECD/Fc. Dos días después de la infección, las HUVEC infectadas se volvieron a sembrar en placas de 24 pocillos a  $1,5 \times 10^5$  células en triplicado y se cultivaron durante 24 horas, y se transfectaron con 12,5 ng de pRL-SV40 (Promega) y 137,5 ng de pGA981-6 usando reactivo de transfección Effectene (Qiagen). Las células se recogieron bien 1 ó 2 días después de la transfección y se determinó la actividad luciferasa usando el Sistema de Ensayo Informador Dual-Luciferase® (Promega).

*Ensayo de formación de brotes*

Para preparar geles de colágeno, se mezcló una disolución helada de colágeno porcino de tipo I (Nitta gelatin, Tokio, Japón) con medio 10X RPMI1640 y tampón de neutralización en la proporción de 8:1:1. Se añadieron alícuotas de 400  $\mu$ l de gel de colágeno a placas de 24 pocillos y se dejó que gelificara durante al menos 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Después de la infección adenoviral (anteriormente), las HUVEC se recogieron y plaquearon a  $1,3 \times 10^5$  células por pocillo en la parte superior del gel de colágeno en placas de 24 pocillos en 0,8 ml de medio EGM2. Las HUVEC estaban casi confluentes 48 horas después de la siembra. Después de la siembra, el medio se cambió cada 2 días durante 1 semana. Se observó la formación de brotes y se hicieron fotografías después de 8 días con una cámara digital Olympus montada en un microscopio. Para la cuantificación del número de brotes, se seleccionaron aleatoriamente 5 campos para cada pocillo y dos investigadores contaron los brotes con microscopio de una manera ciega.

**Resultados y discusión***Las proteínas de fusión NOTCHECD/Fc funcionan como antagonistas de Notch**Antagonistas de Notch-proteínas de fusión NotchECD/Fc*

Hemos preparado varios antagonistas de Notch (Figura 2). Nuestra estrategia fue fusionar la secuencia codificadora de las repeticiones de EGF de Notch en el Dominio Extracelular (ECD) con el dominio Fc humano o de ratón. Este diseño resulta en una proteína secretada sin función de señalización pero que retiene el dominio de unión a ligando y así debería unirse a e inhibir la función del ligando. Nos referimos a estas proteínas como "NotchECD/Fc" y se han preparado las cuatro Notch1-4ECD/Fc. El dominio Fc facilita la purificación por afinidad y la detección de la proteína por inmunotransferencia o inmunohistoquímica.

*Ensayo de los antagonistas de Notch*

Se usó un sistema de co-cultivo *in vitro* (Figura 3) con ligandos expresados en una célula y activación del receptor Notch valorada en otra célula para medir la activación transcripcional de la ruta Notch. Usamos este ensayo de co-cultivo para mostrar que Notch1ECD/Fc funciona para bloquear la señalización de Notch dependiente de ligando (Figura 4). El vector de expresión N1ECD/Fc se co-transfectó a diferentes proporciones con Notch1 de longitud completa y el informador de luciferasa CSL en células HeLa, seguido de co-cultivo con células 293 que expresaban el ligando. Observamos que la activación de la señalización de Notch1 por los ligandos Notch se redujo por la expresión de N1ECD/Fc. Este efecto presentó dependencia de la concentración; una proporción 2:1 de N1ECD/Fc a Notch1 fue más efectiva para inhibir la señalización que una proporción 1:1. Notch1ECD/Fc pudo bloquear la señalización mediada por Jagged1, semejante a Delta 1 o semejante a Delta 4.

*Expresión y purificación de los antagonistas de Notch*

Hemos preparado líneas celulares CHO y HeLa que expresan NotchECD/Fc usando vectores retrovirales para el propósito de la purificación de proteínas. Las proteínas N1ECD/Fc se secretan (Figura 5); como se muestra en el medio condicionado recogido de las líneas HeLa-NotchECD/Fc y purificado con Proteína A(pA) agarosa. La muestra purificada por pA (Sup) y lisados celulares completos (Lys) se inmunotransfirieron con anticuerpo  $\alpha$ -Fc (Figura 5, panel A) demostrando que N1ECD/Fc se secreta en el medio. Los vectores de adenovirus para NotchECD/Fc se usaron para infectar células HeLa y los lisados de estas células se inmunotransfirieron con anticuerpos  $\alpha$ -Fc

demostrando que expresan proteínas NotchECD/Fc (1, 2, 3, 4) (Figura 5, panel B). Actualmente estamos purificando N1ECD/Fc del medio condicionado de células CHO usando cromatografía de afinidad con pA.

*Definición de la inhibición angiogénica usando proteínas de fusión Notch*

*La activación de la señalización Notch puede detectarse usando la actividad promotora CBF1*

5 Se puede medir la función de señalización de Notch midiendo la actividad transcripcional del promotor CBF1, que se activa por la unión de Notch-IC a CBF1. Medimos la actividad promotora de CBF1 en HUVEC que se infectaron con adenovirus que codificaban VEGF-165 a diferentes MOI (Figura 6). La inducción del promotor CBF1 se detectó claramente en HUVEC infectadas con Ad-VEGF, comparado con células infectadas con Ad-LacZ de una manera dependiente de MOI. Estos datos mostraron que la sobreexpresión de VEGF podía activar la señalización de Notch en HUVEC. Así, VEGF indujo la actividad de señalización de Notch.

10 Nos preguntamos si las proteínas de fusión Notch podían bloquear la activación inducida por VEGF de la señalización de Notch. La co-infección de la proteína de fusión Ad-Notch con Ad-VEGF redujo claramente la activación de la actividad promotora de CBF1 inducida por la infección con Ad-VEGF solo (Figura 7). En el caso de la infección a 40 MOI para cada adenovirus en la Figura 7 (panel A), se detectaron una inhibición del 60% a las 24 hr y una inhibición del 90% a las 48 hr después de la transfección del gen informador y también la actividad inhibidora del señuelo Notch fue dependiente de MOI de la proteína de fusión Ad-Notch.

*Las proteínas de fusión Notch bloquean el inicio del brote angiogénico inducido por VEGF*

15 En este experimento, evaluamos el efecto del señuelo Notch en la inducción de la gemación (inicio de brote) por VEGF-165 sobreexpresado en HUVEC. Cuando HUVEC infectadas con Ad-VEGF se cultivaron en gel de tipo de colágeno durante 8 días, la gemación se indujo en el gel de colágeno. Esta inducción de la gemación por VEGF sobreexpresado se inhibió claramente por coinfección de adenovirus que codificaban la proteína de fusión Notch (Figura 8). La proteína de fusión Ad-Notch en sí misma tuvo menos efecto en la morfología.

20 En la Figura 9, contamos las yemas por campo usando el microscopio. La infección de Ad-VEGF en HUVEC incrementó el número de yemas dependiendo de la MOI usada. La gemación inducida por Ad-VEGF se inhibió claramente. Estos datos sugieren que VEGF indujo la gemación de HUVEC a través de la activación de la señalización de Notch y que la proteína de fusión Notch podía inhibir la gemación inducida por VEGF.

**Referencias citadas en la segunda serie de experimentos**

1. Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, y M.E. Fortini. 1995. Notch signaling. *Science* 268:225-232.
2. Bailey, A.M., y J.W. Posakony. 1995. Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes & Development* 9:2609-22.
3. Bettenhausen, B., M. Hrabe de Angelis, D. Simon, J.L. Guenet, y A. Gossler. 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of D11, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Development* 121:2407-18.
4. Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, y S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90:281-91.
5. Caronti, B., L. Calandriello, A. Francia, L. Scorretti, M. Manfredi, T. Sansolini, E.M. Pennisi, C. Calderaro, y G. Palladini. 1998. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL). Neuropathological and in vitro studies of abnormal elastogenesis. *Acta Neurol Scand.* 98:259-67.
6. Desmond, D.W., J.T. Moroney, T. Lynch, S. Chan, S.S. Chin, D.C. Shungu, A.B. Naini, y J.P. Mohr. 1998. CADASIL in a North American family: clinical, pathologic, and radiologic findings [véanse los comentarios]. *Neurology* 51:844-9.
7. Dunwoodie, S.L., D. Henrique, S.M. Harrison, y R.S. Beddington. 1997. Mouse D113: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124:3065-76.
8. Eastman, D.S., R. Slee, E. Skoufos, L. Bangalore, S. Bray, y C. Delidakis. 1997. Synergy between suppressor of Hairless and Notch in regulation of Enhancer of split m gamma and m delta expression. *Mol Cell Biol.* 17:5620-5634.
9. Fortini, M.E., y S. Artavanis-Tsakonas. 1993. Notch: neurogenesis is only part of the picture. *Cell* 75:1245-7.
10. Gale, N.W., y G.D. Yancopoulos. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes and Development* 13:1055-1066.
11. Gallahan, D., y R. Callahan. 1997. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* 14:1883-90.
12. Greenwald, I. 1994. Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Current Opinion in Genetics & Develop-*

ment 4:556-62.

13. Greenwald, I. 1998. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12:1751-62.
14. Henderson, A.M., S.J. Wang, A.C. Taylor, M. Aitkenhead, γ C.C.W. Hughes. 2001. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem.* 276:6169-6176.
15. Hicks, C., S.H. Johnston, G. diSibio, A. Collazo, T.F. Vogt, γ G. Weinmaster. 2000. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nature Cell Biology* 2:515-520.
16. Hsieh, J.J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M.G. Peterson, γ S.D. Hayward. 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Molecular & Cellular Biology* 16:952-9.
17. Hsieh, J.J., D.E. Nofziger, G. Weinmaster, γ S.D. Hayward. 1997. Epstein-Barr virus immortalization: Notch2 interacts with CBF1 and blocks differentiation. *J Virol.* 71:1938-45.
18. Jarriault, S., C. Brou, F. Logeat, E.H. Schroeter, R. Kopan, γ A. Israel. 1995. Signaling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377:355-358.
19. Joutel, A., F. Andreux, S. Gaulis, V. Domenga, M. Cecillon, N. Battail, N. Piga, F. Chapon, C. Godfrain, γ E. Tournier-Lasserre. 2000. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients [véanse los comentarios]. *J Clin Invest.* 105:597-605.
20. Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamowitch, V. Domenga, M. Cecillon, E. Marechal, J. Maciazek, C. Vayssiere, C. Cruaud, E.A. Cabanis, M.M. Ruchoux, J. Weissenbach, J.F. Bach, M.G. Bousser, γ E. Tournier-Lasserre. 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383:707-10.
21. Kopan, R., E.H. Schroeter, H. Weintraub, γ J.S. Nye. 1996. Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1683-8.
22. Krebs, L.T., Y. Xue, C.R. Norton, J.R. Shutter, M. Maguire, J.P. Sundberg, D. Gallahan, V. Closson, J. Kitajewski, R. Callahan, G.H. Smith, K.L. Stark, γ T. Gridley. 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes and Development* 14:1343-1352.
23. Lardelli, M., J. Dahlstrand, γ U. Lendahl. 1994. The novel Notch homologue mouse Notch3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mechanism of Development* 46:123-136.
24. Lawson, N.D., N. Scheer, V.N. Pham, C. Kim, A.B. Chitnis, J.A. Campos-Ortega, γ B.M. Weinstein. 2001. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128:3675-3683.
25. Lewis, J. 1998. Notch signaling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol.* 9:583-589.
26. Lieber, T., S. Kidd, E. Alcom, V. Corbin, and M.W. Young. 1993. Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* 7:1949-1965.
27. Lindner, V., C. Booth, I. Prudovsky, D. Small, T. Maciag, γ L. Liaw. 2001. Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alteration in cell matrix and cell-cell interactions. *Pathology* 159:875-883.
28. Lindsay, C.E., C.J. Shawber, J. Boulter, γ G. Weinmaster. 1995. Jagged: A mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80:909-917.
29. Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N.G. Seidah, γ A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is

cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8108-12.

30. Lyman, D., & M.W. Young. 1993. Further evidence for function of the *Drosophila* Notch protein as a transmembrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10395-10399.

31. Matsuno, K., M.J. Go, X. Sun, D.S. Eastman, & S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Suppressor of Hairless-independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development* 124:4265-4273.

32. Nakagawa, O., D.G. McFadden, M. Nakagawa, H. Yanagisawa, T. Hu, D. Srivastava, & E.N. Olson. 2000. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13655-13660.

33. Oberg, C., J. Li, A. Pauley, E. Wolf, M. Gurney, and U. Lendahl. 2001. The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem.* 276:35847-35853.

34. Owens, G.K. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 75:487-527.

35. Rebay, I., R.G. Fehon, & S. Artavanis-Tsakonas. 1993. Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74:319-29.

36. Robey, E. 1997. Notch in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 7:551-7.

37. Roehl, H., M. Bosenberg, R. Billech, & J. Kimble. 1996. Roles of the RAM and ANK domains in signaling by the *C. elegans* GLP-1 receptor. *Embo J.* 15:7002-7012.

38. Rogers, S., R. Wells, & M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degrade proteins: The PEST hypothesis. *Science* 234:364-368.

39. Sasai, Y., R. Kageyama, Y. Tagawa, R. Shigemoto, & S. Nakanishi. 1992. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes & Dev.* 6:2620-2634.

40. Shawber, C., J. Boulter, C.E. Lindsell, & G. Weinmaster. 1996a. Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol.* 180:370-6.

41. Shawber, C., D. Nofziger, J.J. Hsieh, C. Lindsell, O. Bogler, D. Hayward, & G. Weinmaster. 1996b. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1- independent pathway. *Development* 122:3765-73.

42. Shimizu, K., S. Chiba, T. Saito, T. Takahashi, K. Kumano, H. Hamada, & H. Hirai. 2002. Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for the release of the Notch2 intracellular domain. *Embo J.* 21:294-302.

43. Shutter, J.R., S. Scully, W. Fan, W.G. Richards, J. Kitajewski, G.A. DeBlandre, C.R. Kintner, & K.L. Stark. 2000a. D114, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 14:1313-1318.

44. Shutter, J.R., S. Scully, W. Fan, W.G. Richards, J. Kitajewski, G.A. DeBlandre, C.R. Kitner, & K.L. Stark. 2000b. D114, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes and Development* 14:1313-1318.

45. Struhl, G., K. Fitzgerald, & I. Greenwald. 1993. Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* 74:331-45.

46. Swiatek, P.J., C.E. Lindsell, F. Franco del Amo, G. Weinmaster, & T. Gridley. 1994. Notch 1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes & Development* 8:707-719.

47. Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa, & T. Honjo. 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol.* 5:1416-1423.

48. Tietze, K., N. Oellers, & E. Knust. 1992. Enhancer of splitD, a dominant mutation of *Drosophila*, and its use

in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6152-6156.

49. Uyttendaele, H., J. Ho, J. Rossant, y J. Kitajewski. 2001. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *PNAS*. 98:5643-5648.

50. Uyttendaele, H., G. Marazzi, G. Wu, Q. Yan, D. Sassoon, y J. Kitajewski. 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122:2251-9.

51. Vervoort, M., C. Dambly-Chaudiere, y A. Ghysen. 1997. Cell fate determination in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol.* 7:21-28.

52. Villa, N., L. Walker, C.E. Lindsell, J. Gasson, M.L. Iruela-Arispe, y G. Weinmaster. 2001. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mechanisms of Development* 108:161-164.

53. Weinmaster, G. 1997. The Ins and Outs of Notch Signaling. *Mol Cell Neurosci.* 9:91-102.

54. Weinmaster, G. 1998. Notch signaling: direct or what? *Curr Opin Genet Dev.* 8:436-42.

55. weinmaster, G., V.J. Roberts, and G. Lemke. 1992. Notch 2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116:931-941.

56. Weinmaster, G., V.J. Roberts, y G.A. Lemke. 1991. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 113:199-205.

57. Wettstein, D.A., D.L. Turner, y C. Kintner. 1997. The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development* 124:693-702.

58. Wu, G., E.J. Hubbard, J.K. Kitajewski, y I. Greenwald. 1998. Evidence for functional and physical association between *Caenorhabditis elegans* SEL-10, a Cdc4p-related protein, and SEL-12 presenilin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15787-91.

59. Wu, G., S.A. Lyapina, I. Das, J. Li, M. Gurney, A. Pauley, I. Chui, R.J. Deshaies, y J. Kitajewski. 2001. SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol.* 21:7403-7015.

60. Xue, Y., X. Gao, C.E. Lindsell, C.R. Norton, B. Chang, C. Hicks, M. Gendron-Maguire, E.B. Rand, G. Weinmaster, y T. Gridley. 1999. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet.* 8:723-30.

### Tercera serie de experimentos

#### *VEGF inicia la angiogénesis mediante una activación de la señalización Notch*

5 Las rutas de señalización tanto de VEGF como de Notch son críticas para el desarrollo vascular. Aquí mostramos que VEGF activa la señalización Notch para iniciar la angiogénesis. VEGF incrementó la expresión de Delta4 y Notch4 causando la activación de la señal Notch e induciendo filopodia en células endoteliales primarias cultivadas. Los estudios usando inhibidores del receptor de VEGF muestran que la activación de la señal Notch a su vez aumenta la acción de VEGF induciendo la expresión de VEGFR-1 (Flt-1). Otros elementos de la acción de VEGF, incluyendo la inducción de MMP-9 y MT1-MMP, están mediados por Notch. Usando ensayos *in vivo* para modelizar la neo-vascularización de la piel inducida por VEGF, encontramos que un inhibidor de Notch secretado (proteína de fusión basada en Notch) bloquea la neo-vascularización inducida por VEGF y la inducción de la expresión de VEGFR-1. Así, la señalización de Notch es un requisito para la angiogénesis regulada por VEGF, probablemente a nivel del inicio.

15 VEGF es un regulador clave de la progresión de la angiogénesis que consiste en múltiples procesos, tales como la degradación de ECM, gemación (formación de filopodia), proliferación, supervivencia y migración de las células endoteliales. Aunque la mayor parte de las etapas podrían co-operar con moléculas aguas abajo de la señalización de VEGF, no se sabe cómo estas etapas están reguladas de forma coordinada para resultar en eventos

morfogenéticos más complejos, tales como brote angiogénico. La señalización Notch es un mecanismo de señalización conservado evolutivamente que funciona para regular las decisiones sobre el destino celular (1). Después de la unión por un ligando, tal como Jagged y semejante a Delta, el dominio citoplásmico de Notch (NotchIC) se libera por presenilina/γ-secretasa, se transloca al núcleo, interacciona con el represor transcripcional CSL (CBF1/Su(H)lag2) y lo convierte en un activador transcripcional (1). Los papeles de la señalización Notch en el desarrollo vascular fueron sugeridos por estudios de ratones con mutación dirigida (2). Como la activación de Notch en el endotelio también altera el remodelado vascular, la señalización Notch apropiada es esencial para el desarrollo vascular (3). Aunque se sugiere la relevancia de Notch para la señalización de VEGF (4-6), todavía no está claro cómo la señalización Notch tiene un papel en la angiogénesis regulada por VEGF y si la señalización Notch participa en la angiogénesis fisiológica y patológica en la vasculatura adulta.

El crecimiento de HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana) depende de VEGF (Figs, 26A y 26B) y las respuestas biológicas relacionadas con la diferenciación, tales como brote, y puede evaluarse en un estadio temprano (7). En primer lugar, examinamos si VEGF transducido adenoviralmente inducía la expresión tanto de Notch como de ligando Notch en HUVEC cultivadas con medio completo que contenía bFGF (Fig. 22A), como se indica (5). Los análisis por RT-PCR mostraron que el ARNm tanto de D14 como de Notch4 se reguló al alza en HUVEC transducidas con VEGF adenoviralmente (Ad-VEGF-HUVEC), comparado con HUVEC transducidas con LacZ adenoviralmente (Ad-LacZ-HUVEC) (Fig. 22A). El VEGF transducido no pareció inducir la expresión de Jagged1 y Notch1. El VEGF transducido también activó la señalización Notch de una manera dependiente de la dosis midiendo la actividad informadora luciferasa CSL (Fig. 22B), que se transactivó con la señalización Notch (8). La señalización Notch se activó a una dosificación mayor de Ad-VEGF, comparado con la proliferación (Fig. 26A). Como SU5416, que es un inhibidor de las quinasas de VEGFR, disminuyó la actividad informadora luciferasa CSL inducida por VEGF (Fig. 22C), VEGF indujo la señalización Notch a través de la activación de la quinasa del receptor. Como los mutantes de Notch que carecían de los dominios tanto transmembrana como citoplásmico funcionaban como inhibidores dominantes negativos frente a la señalización Notch (9), preparamos una proteína de fusión basada en Notch o señuelo (N1ECDFc) para inhibir la señalización Notch (Fig. 22D). El análisis por transferencia Western del medio condicionado de HUVEC transducidas con Ad-N1ECDFc (Ad-N1ECDFc-HUVEC) demostró que N1ECDFc se expresaba y se secretaba bien (Fig. 22E). Usando un ensayo de co-cultivo, en el que las células Bosc que expresaban ligandos Notch (bien J1, D11 o D14) activaban la señalización Notch en células HeLa que expresaban Notch1 comparado con células Bosc control, determinamos la inhibición de la señalización Notch con la transfección de un plásmido de expresión de N1ECDFc (Fig. 22F). Después, examinamos si N1ECDFc inhibía la activación de la señalización Notch por VEGF transducido en HUVEC (Fig. 22G). La co-transducción de Ad-N1ECDFc con Ad-VEGF en HUVEC disminuyó claramente la actividad luciferasa CSL inducida por VEGF. Gerhardt et al. reportaron que VEGF controlaba la angiogénesis en la retina postnatal temprana guiando la extensión de filopodia a las puntas de los brotes vasculares (10). Durante el brote angiogénico, la formación de una célula endotelial especializada que hace proyecciones de filopodia entre células endoteliales quiescentes, podría ser uno de los eventos tempranos. Aquí queremos decir formación de una única célula endotelial que hace protrusiones de filopodia como gemación. La gemación de las células endoteliales primarias se induce cultivándolas tridimensionalmente en gel de fibrina o colágeno (11). En el caso en el que Ad-VEGF-HUVEC se cultivaron en gel de colágeno con medio completo, HUVEC transducidas hicieron extensiones de filopodia en el gel de colágeno durante 5 días (Fig. 22H) y el número de yemas se incrementó de una manera dependiente de la dosis (Fig. 27A). La activación de la señalización Notch por adenovirus que codifican la forma activada de Notch4 (Ad-Notch4/int3) indujo la gemación de HUVEC (12) y la de Notch1 (Ad-N1IC) también indujo la gemación de HUVEC (Fig. 23A y 27B). Como tanto la señalización de VEGF como de Notch inducen la gemación de HUVEC, examinamos si N1ECDFc inhibía la gemación de HUVEC inducida por VEGF (Fig. 22H-I). La gemación de Ad-VEGF-HUVEC se inhibió claramente por co-transducción de Ad-N1ECDFc. Ni HUVEC transducidas con Ad-Lac ni Ad-N1ECDFc formaron yemas (Fig. 22H). N1ECDFc inhibió la gemación de HUVEC inducida por VEGF sin afectar el número de células (Fig. 22). N1ECDFc transducido no alteró claramente la proliferación de HUVEC, mientras la de HUVEC transducidas con Ad-N1IC se inhibió de una manera dependiente de la dosis (Fig. 28A), consistente con la eficacia inhibidora de la señalización Notch frente a la proliferación endotelial (13).

Para ensayar si la señalización Notch está aguas abajo de VEGF, evaluamos tres inhibidores distintos para tirosina quinasas de receptor, incluyendo VEGFR en la gemación de HUVEC inducida por N1IC, porque existían tres factores de crecimiento en el medio completo (Fig. 23A-C). A una concentración de 1 μM, cada compuesto mostró una inhibición selectiva frente a cada quinasa (datos no mostrados). Ni PD166866 ni ZD1893 afectaron la gemación de Ad-N1IC-HUVEC, mientras SU5416 la inhibió claramente (Fig. 23A-B). SU5416 inhibió selectivamente la gemación de Ad-N1IC-HUVEC con menor reducción de viabilidad a concentraciones menores (Fig. 23C). Como Taylor et al. reportaron que Notch regulaba a la baja la expresión de Flk1/KDR/VEGFR2 (14), era improbable que Notch co-operara con Flk1 para estimular la gemación. Así, examinamos si la activación de la señalización Notch afectaba la expresión de Flt1/VEGFR1 en HUVEC, porque SU5416 inhibe la actividad quinasa tanto de Flt1 como Flk1 (15). El análisis por RT-PCR demostró que la expresión del ARNm de Flt1 estaba regulada al alza en Ad-N1IC-HUVEC, mientras la expresión del marcador de célula endotelial, ARNm de CD31, no lo hizo comparado con la que se producía en Ad-LacZ-HUVEC (Fig. 23D). El análisis por transferencia Western también mostró que la expresión de la proteína Flt1 estaba regulada al alza en Ad-N1IC-HUVEC (Fig. 23E). Así, examinamos si P1GF, que es un ligando selectivo para Flt1, estimulaba la gemación de HUVEC en las que Flt1 estaba regulado al alza mediante la activación de la señalización Notch (Fig. 23F-G). P1GF incrementó el número de yemas Ad-N1IC-HUVEC un 150%,

- comparado con la ausencia de PIGF (Fig. 23F). Además, PIGF incrementó las yemas de HUVEC que contenían múltiples filopodias un 250% (Fig. 23G). Mientras la reducción de la expresión de Flt1 usando ARN de interferencia pequeños (siARN) para Flt1 inhibió la gemación de Ad-N1IC-HUVEC (Fig. 23J), la transfección de éstos disminuyó selectivamente la expresión del ARNm de Flt1 (Fig. 23H) y la de la proteína Flt1 (Fig. 23I). Aunque la reducción de la expresión de Flk1 con siARN de Flk1 también inhibió la gemación de Ad-N1IC-HUVEC (Fig. 30B), la eficacia inhibitoria del siARN de Flk1 fue menor que la del siARN de Flt1 (Fig. 23J). Los efectos del siARN de Flk1 fueron más efectivos en la gemación de Ad-VEGF-HUVEC que en la de Ad-N1IC-HUVEC (Fig. 30B-C). La transfección con siARN de Flt1 inhibió la gemación tanto de Ad-N1IC- como de Ad-VEGF-HUVEC en un grado similar (datos no mostrados).
- 5
- Varios estudios demostraron que VEGF regulaba las actividades gelatinasa en células endoteliales y la significancia de la actividad gelatinasa como MMP-2 y MMP-9 se ha establecido firmemente en la inducción del brote angiogénico (16). Examinamos si VEGF regulaba la actividad gelatinasa mediante la señalización Notch en HUVEC.
- 10
- En zimografía de gelatina, el medio condicionado de Ad-VEGF-HUVEC mostró tanto inducción como activación de MMP9, que empezó a detectarse en el día 6 (Fig. 24A) y activación de MMP2, que se detectó en el día 4 (Fig. 24B), comparado con los de Ad-LacZ-HUVEC. La co-transducción de Ad-N1ECDFc con Ad-VEGF mostró inhibición tanto de la inducción como de la activación de MMP9 (Fig. 24A) y una activación de MMP2 (Fig. 24B). El análisis por RT-PCR demostró que la expresión del ARNm de MMP9 estaba regulada al alza en Ad-N1IC-HUVEC, pero la expresión del ARNm de MMP2 estaba disminuida en Ad-N1IC-HUVEC (Fig. 24C). Como la inducción de la actividad de MMP2 no se detectó en zimografía de gelatina (Fig. 24B), este resultado fue una consecuencia probable. Mientras, la expresión de MT1-MMP, que es capaz de activar MMP2 en la superficie celular (17), estaba regulada al alza tanto a nivel de transcrito como de proteína en Ad-N1IC-HUVEC (Fig. 24D). Como VEGF puede regular tanto la expresión de gelatinasa como MT1-MMP (16), el análisis por RT-PCR demostró que tanto MMP9 como MT1-MMP estaban regulados al alza en Ad-VEGF-HUVEC, comparado con Ad-LacZ-HUVEC y esta inducción se inhibió con la co-transducción de Ad-N1ECDFc (Fig. 24E). La infección con Ad-N1ECDFc solo no afectó la expresión ni de MMP9 ni de MT1-MMP en HUVEC infectadas con Ad-LacZ (datos no mostrados). El requisito de los MMP para el brote angiogénico se ha establecido por inhibidores sintéticos de MMP (16). GM6001 es un inhibidor general frente a los MMP incluyendo MMP2, MMP9 y MT1-MMP (18). GM6001 disminuyó claramente la gemación de Ad-N1IC-HUVEC tanto en gel de colágeno (Fig. 31A-B) como de fibrina (datos no mostrados).
- 15
- 20
- 25
- En el ensayo en ratón de Saco de Aire Dorsal (DAS) (19), transfectantes estables de células 293 que sobreexpresan VEGF121 (293/VEGF) indujeron significativamente angiogénesis *in vivo* (Fig. 25A, panel izquierdo). Esta angiogénesis inducida por VEGF se inhibió claramente por la coexpresión de N1ECDFc, comparado con 293/VEGF solo (Fig. 25A). Se midió la densidad de los vasos y en la Fig. 25B se proporciona un índice de angiogénesis, demostrando que la angiogénesis inducida por 293/VEGF se inhibe por la co-expresión de 293/N1ECDFc (Fig. 25B).
- 30
- También, en el ensayo en ratón de Saco de Aire Dorsal (DAS) (19), la línea celular de cáncer de mama humano, MDA-MB-231 indujo significativamente angiogénesis *in vivo*, presumiblemente mediante la secreción de VEGF (Fig. 25C, panel izquierdo). Esta angiogénesis inducida por VEGF se inhibió claramente por la expresión de N1ECDFc mediada por adenovirus, comparado con adenovirus que expresan LacZ (Fig. 25C). Se midió la densidad de los vasos y en la Fig. 25D se proporciona un índice de angiogénesis, demostrando que la angiogénesis inducida por MDA-MB-231 se inhibe por la expresión de N1ECDFc.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- Flk1 es un transductor de la señal positivo principal para la angiogénesis a través de su fuerte actividad tirosina quinasa en el embrión, mientras se piensa que Flt1 es un transductor de la señal negativo para la angiogénesis. Sin embargo, se demostró un papel positivo para Flt-1 en ratones adultos, ya que el crecimiento *in vivo* de LLC que sobreexpresaban P1GF2 se comprometió severamente en ratones que carecían de dominio quinasa de Flt-1 citoplásmico (20). Notch podría funcionar para alterar la señalización de VEGF induciendo la señalización de Flt-1 y señalización de Flk-1 moderada bien para inducir extensión de filopodia o potenciar el brote angiogénico, ya que la señalización PIGF/Flt-1 alteró el sitio de fosforilación de Flk-1 y potenció angiogénesis miocárdica isquémica (21). De forma interesante, la señalización de Notch también reguló al alza la expresión de PIGF (Fig. 29). Sin embargo, la activación continua de la señalización de Notch inhibe la formación de brotes angiogénicos que contienen lumen multi-celular, como se ha reportado previamente (22). La señalización de Notch debería desactivarse después de la gemación/formación de filopodia y podría requerirse la activación transitoria de la ruta Notch. En un modelo de ratón transgénico de carcinogénesis de células beta pancreáticas (ratones Rip1Tag2) en los que la angiogénesis tumoral depende de VEGF, el nivel de la expresión de VEGF no se incrementa, pero ocurre la movilización de VEGF extracelular almacenado en la matriz hacia los receptores de VEGF. MMP-9 es responsable de esta movilización y la progresión tumoral se inhibió en ratones transgénicos doble nulos Rip1Tag23MMP-9 (23). La expresión de MMP-9 regulada al alza por Notch podría incrementar el nivel local de VEGF en el sitio del brote angiogénico. Mientras Notch también regula al alza la expresión de MT1-MMP, el MMP-2 extracelular podría ser dirigido a la membrana celular de las células endoteliales activadas por Notch. Notch podría determinar el sitio para el brote angiogénico regulando la actividad gelatinasa y la concentración de VEGF. Como MMP-9 endotelial estaba regulado por Flt-1 en metástasis específicas de pulmón (20), Flt-1 podría participar en la inducción de MMP-9 indirectamente.

**Referencias citadas en la tercera serie de experimentos**

1. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* 1999;284(5415):770-776.
2. Shawber CJ, J. K. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays*. 2004;26(3):225-34.
3. Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, J. K. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(10):5643-8.
4. Lawson ND, Vogel AM, BM. W. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* 2002;3(1):127-36.
5. Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, et al. Regulation of Notch1 and D114 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol*. 2003;23(1):14-25.
6. Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(45):5949-54.
7. Montesano R, L. O. Phorbol esters induce angiogenesis in vitro from large-vessel endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1987;130(2):284-91.
8. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, A. I. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*. 1995;377(6547):355-8.
9. Small D, Kovalenko D, Kacer D, Liaw L, Landriscina M, Di Serio C, et al. Soluble Jagged 1 represses the function of its transmembrane form to induce the formation of the Src-dependent chord-like phenotype. *J Biol Chem* 2001;276(34):32022-30.
10. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161(6):1163-77.
11. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, et al. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 1996;132(6):1177-88.
12. Das I, Craig C, Funahashi Y, Jung KM, Kim TW, Byers R, et al. Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J Biol Chem* 2004;279(29):30771-80.
13. Nosedá M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, Smith LL, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 2004;24(20):8813-22.
14. Taylor KL, Henderson AM, CC. H. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* 2002;64(3):372-83.
15. Itokawa T, Nokihara H, Nishioka Y, Sone S, Iwamoto Y, Yamada Y, et al. Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Mol Cancer Ther* 2002;1(5):295-302.

16. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(7):1104-17.
17. Seiki M, Koshikawa N, I. Y. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(2-3):129-43.
18. Yamamoto M, Tsujishita H, Hori N, Ohishi Y, Inoue S, Ikeda S, et al. Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase by hydroxamate inhibitors: an examination of the subsite pocket. *J Med Chem* 1998;41(8):1209-17.
19. Funahashi Y, Wakabayashi T, Semba T, Sonoda J, Kitoh K, K. Y. Establishment of a quantitative mouse dorsal air sac model and its application to evaluate a new angiogenesis inhibitor. *Oncol Res.* 1999;11(7):319-29.
20. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002;2(4):289-300.
21. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PIGF in the intra-and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9(7):936-43.
22. Leong KG, Hu X LL, Nosedá M, Larrivee B, Hull C, Hood L, et al. Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol* 2002;22(8):2830-41.
23. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2(10):737-44.

**Cuarta serie de experimentos**

Expresión de proteínas y ligandos Notch en células endoteliales sanguíneas y linfáticas

5 Se llevó a cabo RT-PCR para Notch1-4, D111, D114 y Jagged1 en ARN aislado de células endoteliales sanguíneas (BEC) y células endoteliales linfáticas (LEC) purificadas de HMVEC. Como se muestra en la Figura 44, Notch1, Notch2, Notch4, D114 y Jagged1 se expresaban tanto en BEC como LEC a un nivel similar. La expresión de Notch3 parece estar restringida a las LEC lo que sugiere que la señalización de Notch3 funciona en el endotelio linfático.

Notch3 se co-expresa con el marcador de células endoteliales linfáticas LYVE-1 y Prox1 en embriones e13.5

10 Se inmunotñieron secciones de 10 micrómetros de embriones de ratón en el día embrionario 13.5 bien para LYVE-1, Prox1 y Notch3. Como se muestra en la Figura 45, Notch3 se expresó en las células que también expresaron los marcadores de células endoteliales linfáticas, LYVE-1 y Prox1.

Prox1 indujo la expresión de Notch3 en células endoteliales sanguíneas

15 Se examinó si la expresión ectópica de Prox1 alteraría la expresión de proteínas o ligandos Notch. Como se muestra en la Figura 46, sección A, veinticuatro horas después de la infección adenoviral bien con Ad-Prox1 o Ad-LacZ, se aisló el ARN total de HUVEC y se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para Notch1-4, D114 y Jagged1. Prox-1 reguló al alza de manera robusta la expresión de Notch3. La expresión de Notch1, Notch2, Notch4, D114 y Jagged1 no se vio afectada significativamente. Como se muestra en la Figura 46, sección B, el Compuesto E (cE), inhibidor de presenilina que inhibe la señalización de Notch, se incubó durante 24 horas en HUVEC infectadas bien con Ad-LacZ o Ad-Prox1. Se aisló el ARN total y se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para determinar la expresión de Notch3. Prox1 indujo la expresión de Notch3 y esta inducción se inhibió por la adición del compuesto E.

Esto sugiere que la inducción por Prox1 de Notch3 depende de la activación de la señal Notch.

Prox1 induce genes diana de Notch en células endoteliales sanguíneas

25 Se infectaron HUVEC con adenovirus que codifican, LacZ, Prox1, N11C o N4/int-3 y se aisló el ARN total 24 horas después de la infección. Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para los genes diana de Notch endoteliales. VEGFR-3, EfrinaB2, Hey1 y Hey2. De manera similar a la activación de la señal de Notch1 y Notch4, Prox1 indujo los cuatro genes (Figura 47, secciones A y B). Se desconoce la expresión de Hey1 y Hey2 en el endotelio linfático.

La inducción de genes diana de Notch por Prox1 depende de la señalización de Notch en las células endoteliales sanguíneas

Se infectaron HUVEC con adenovirus que codifican, LacZ, Prox1, N1IC o N4/int-3. El compuesto E (cE), inhibidor de presenilina que inhibe la señalización de Notch, se incubó durante 24 horas en HUVEC infectadas bien con Ad-LacZ o Ad-Prox1 y se aisló el ARN total. Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para los genes diana de Notch endoteliales. VEGFR-3, EfrinaB2 y Hey2. La inducción mediada por Prox1 de los genes diana de Notch, EfrinaB2, VEGFR-3 y Hey2 se inhibió por la adición del inhibidor de la señalización de Notch, Compuesto E, como se muestra en la Figura 48. Así, Prox1 regula la expresión de EfrinaB2, VEGFR-3 y Hey2 a través de Notch.

### Quinta serie de experimentos

#### 10 Antecedentes

Pueden trazarse avances sobre una función para Notch en la homeostasis vascular a partir del trastorno neurovascular humano, Arteriopatía Cerebral Autosómica Dominante con Infartos Subcorticales y Leucoencefalopatía (CADASIL). En la mayoría de los pacientes, se ha encontrado que CADASIL se correlaciona con mutación con cambio de sentido en Notch3. CADASIL es un trastorno autosómico dominante de inicio tardío (edad media de 45) caracterizado por migrañas con aura e ictus recurrentes que dan lugar a síntomas psiquiátricos, disminución cognitiva progresiva, demencia y muerte<sup>(81)</sup>. Estos síntomas neuropatológicos surgen secundariamente a una arteriopatía con desarrollo lento, asociada con la desorganización y destrucción de las células de músculo liso vascular que rodean las arterias y arteriolas cerebrales. La regresión de las células de músculo liso vascular está asociada con una disminución en el espesor de la pared de los vasos, una pérdida de la matriz extracelular y debilidad de la pared de los vasos<sup>(82)</sup>. En las células de músculo liso vascular, existe una acumulación del dominio extracelular de Notch3 y en la matriz extracelular, una deposición anormal de partículas referidas como materiales osmofílicos granulares (GOM)<sup>(83)</sup>. En este trastorno, las lesiones arteriales no están restringidas al cerebro y se encuentran en arterias de la piel y la retina<sup>(83-85)</sup>.

El fenotipo de CADASIL se correlaciona con la expresión de Notch3 en las células de músculo liso vascular<sup>(70, 81)</sup>. Siendo la hipótesis que Notch3 funciona para mantener las interacciones célula-célula o la comunicación entre las células de músculo liso vascular y las células endoteliales arteriales. Un estudio reciente ha recreado la patología de los vasos en CADASIL en ratones transgénicos que expresan un transgén Notch3 que codifica la mutación R90C de CADASIL específicamente en las células de músculo liso vascular<sup>(86)</sup>. La vasculatura de estos ratones mostró una arteriopatía clásica de CADASIL, incluyendo depósitos de GOM y acumulación de Notch3. Sin embargo, estas características estuvieron precedidas de la alteración del anclaje y adhesión de células de músculo liso vascular a células vecinas seguido de degeneración de las células de músculo liso vascular. Así, CADASIL resulta del contacto y viabilidad reducidos de las células de músculo liso vascular y la deposición de GOM y acumulación del dominio extracelular de Notch3 son consecuencias secundarias de este deterioro celular. Consistente con un papel para Notch3 en la supervivencia celular, la expresión de una forma constitutivamente activa de Notch3 en células de músculo liso aórtico de rata resultó en la inducción de cFlip, un antagonista de la apoptosis dependiente de Fas<sup>(87)</sup>. Además, la expresión ectópica de Hey1 en células de músculo liso vascular cultivadas estimuló la supervivencia celular a través de Akt e inhibió así la apoptosis en respuesta a ausencia de suero y ligando Fas<sup>(88)</sup>. Tomados conjuntamente, estos datos indican que Notch3 mantiene la homeostasis de los vasos arteriales estimulando la supervivencia de las células de músculo liso vascular. La permeabilidad de la pared de los vasos arteriales resultante podría surgir de la muerte de las células de músculo liso vascular o un fallo de las células de músculo liso vascular para comunicarse con sus células endoteliales vecinas. La alteración de la actividad de Notch3 en ratones puede ayudar a definir la naturaleza de este defecto.

La actividad específica de las proteínas Notch3 mutantes de CADASIL todavía se entiende poco. Una complicación en la interpretación de la función de Notch3 mutante surge de estudios *in vitro* conflictivos que han mostrado que Notch3 citoplásmico truncado puede bien inhibir o activar el factor de transcripción CSL<sup>(89,90)</sup>.

La activación de la señalización de Notch en las células de músculo liso vascular resulta en letalidad embrionaria.

Notch3 se expresa y es activo en células que rodean los vasos sanguíneos, las células de músculo liso y pericitos. Las células de músculo liso son importantes para la función cardiovascular y deben estar sanas para prevenir el ictus. Los pericitos pueden contribuir al crecimiento de los vasos tumorales. No se piensa que Notch1 y Notch4 funcionen en estos tipos celulares.

Por lo tanto, las proteínas de fusión Notch3 descritas en la presente memoria pueden ser útiles para prevenir el ictus mediante la prevención de la actividad anormal de Notch3. Además, las proteínas de fusión Notch3 pueden ser útiles para mantener las células de músculo liso vascular, para restringir el crecimiento o función de los pericitos tumorales, o para influir en la angiogénesis retiniana mediante la modulación de la función de los pericitos.

Hemos construido un ratón transgénico que expresa una forma activada de Notch1 (N1IC) bajo el control del promotor alfa del factor de elongación 1 (EF1 $\alpha$ ) en tejidos que expresan la recombinasa Cre, referido como EF1 $\alpha$ <sup>N1IC+</sup> (Fig. 49). EF1 $\alpha$ <sup>N1IC+</sup> es viable y fértil (Fig. 50). Hemos expresado N1IC en células de músculo liso vascular cruzando EF1 $\alpha$ <sup>N1IC+</sup> con una línea de ratón SM22-Cre (SM22<sup>Cre/+</sup>). Los dobles transgénicos resultantes

5 SM22<sup>Crel+</sup>, EF1 $\alpha$ <sup>N1Cl+</sup> mueren a E9.5 (Fig. 50), Los embriones SM22<sup>Crel+</sup>, EF1 $\alpha$ <sup>N1Cl+</sup> presentan defectos miocárdicos que creemos son los responsables de la letalidad embrionaria. Consistente con estos defectos en las células de músculo liso miocárdico, observamos una alteración en la expresión del marcador de las células de músculo liso vascular, actina alfa de células de músculo liso en animales transgénicos SM22<sup>Crel+</sup>, EF1 $\alpha$ <sup>N1Cl+</sup> E9.5 (Fig. 51). Estos resultados demuestran que una señalización de Notch incrementada en las células de músculo liso vascular altera el desarrollo cardiovascular embrionario.

#### Referencias citadas en la quinta serie de experimentos

81. Viitanen M, Kalimo H. CADASIL: Hereditary arteriopathy leading to multiple brain infarcts and dementia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000;903:273-84.
82. Brulin P, Godfraind C, Leteurtre E, Ruchoux MM. Morphometric analysis of ultrastructural vascular changes in CADASIL: analysis of 50 skin biopsy specimens and pathogenic implications. *Acta. Neuropathol.* 2002;104:241-8.
83. Uyama E, Tokunaga M, Suenaga A, Kotorii S, Kamimura K, Takahashi K, Tabira T, Uchino M. Arg133Cys mutation of Notch3 in two unrelated Japanese families with CADASIL. *Intern. Med.* 2000;39(9):732-7.
84. Joutel A, Favrole P, Labauge P, Chabriat H, Lescoat C, Andreux F, Domenga V, Cecillon M, Vahedi K, Ducros A y otros. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet* 2001;358:2049-51.
85. Smith BW, Henneberry J, Connolly T. Skin biopsy findings in CADASIL. *Neurology* 2002;59(6):961.
86. Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, Maciazek J, Limol S, Tournier-Lasserre E, Joutel A. Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Am. J. Path.* 2003;162(1):329-42.
87. Wang W, Prince CZ, Mou Y, Pollman MJ. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. *J Biol Chem* 2002;277(24):21723-9.
88. Wang W, Prince CZ, Hu X, Pollman MJ. HRT1 modulates vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308(3):596-601.
89. Beatus P, Lundkvist J, Oberg C, Lendahl U. The Notch3 intracellular domain represses Notch1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* 1999;126(17):3925-35.
90. Saxena MT, Schroeter EH, Mumm JS, Kopan R. Murine notch homologs (N1-4) undergo presenilin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 2001;276(43):40268-73.

**Listado de Secuencias**

<110> The Trustees of columbia University in The City of New York Kitajewski, Jan Shawber, Carrie

<120> Proteínas de fusión basadas en Notch3 humanas como inhibidores señuelo de la señalización de Notch3

5

<130> 79285-PCT/JPW/WS

<160> 34

10

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1433

<212> PRT

15

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

Met Pro Arg Leu Leu Ala Pro Leu Leu Cys Leu Thr Leu Leu Pro Ala  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Gly Leu Arg Cys Ser Gln Pro Ser Gly Thr Cys Leu  
20 25 30

Asn Gly Gly Arg Cys Glu Val Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys  
35 40 45

Ser Gly Ala Phe Val Gly Gln Arg Cys Gln Asp Pro Ser Pro Cys Leu  
50 55 60

Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys Tyr Val Val Asp His Gly  
65 70 75 80

Gly Ile Val Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Pro Leu Gly Phe Ser Gly Pro  
85 90 95

Leu Cys Leu Thr Pro Leu Ala Asn Ala Cys Leu Ala Asn Pro Cys Arg  
100 105 110

Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg  
115 120 125

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys  
130 135 140

Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ser  
145 150 155 160

Ser Tyr Ile Cys Gly Cys Pro Pro Gly Phe His Gly Pro Thr Cys Arg  
165 170 175

Gln Asp Val Asn Glu Cys Ser Gln Asn Pro Gly Leu Cys Arg His Gly

20



ES 2 532 405 T3

Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Ile Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp  
 450 455 460

Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro  
 465 470 475 480

Gly Tyr Glu Gly Val Tyr Cys Glu Ile Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser  
 485 490 495

Ser Pro Cys Leu His Asn Gly Arg Cys Val Asp Lys Ile Asn Glu Phe  
 500 505 510

Leu Cys Gln Cys Pro Lys Gly Phe Ser Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp  
 515 520 525

Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu  
 530 535 540

Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly  
 545 550 555 560

Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His  
 565 570 575

Ile Gly Leu Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Gln  
 580 585 590

Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys His  
 595 600 605

Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Tyr  
 610 615 620

Tyr Leu Cys Leu Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile  
 625 630 635 640

Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu  
 645 650 655

Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly  
 660 665 670

Ser Met Cys Asn Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Ser Pro Cys His  
 675 680 685

Asn Gly Gly Thr Cys Glu Asp Gly Ile Ala Gly Phe Thr Cys Arg Cys  
 690 695 700

Pro Glu Gly Tyr His Asp Pro Thr Cys Leu Ser Glu Val Asn Glu Cys  
 705 710 715 720

ES 2 532 405 T3

Asn Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Ala Cys Arg Asp Gly Leu Asn Gly  
 725 730 735  
 Tyr Lys Cys Asp Cys Ala Pro Gly Trp Ser Gly Thr Asn Cys Asp Ile  
 740 745 750  
 Asn Asn Asn Glu Cys Glu Ser Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys  
 755 760 765  
 Lys Asp Met Thr Ser Gly Tyr Val Cys Thr Cys Arg Glu Gly Phe Ser  
 770 775 780  
 Gly Pro Asn Cys Gln Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys  
 785 790 795 800  
 Leu Asn Gln Gly Thr Cys Ile Asp Asp Val Ala Gly Tyr Lys Cys Asn  
 805 810 815  
 Cys Pro Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Cys Glu Val Val Leu Ala Pro  
 820 825 830  
 Cys Ala Thr Ser Pro Cys Lys Asn Ser Gly Val Cys Lys Glu Ser Glu  
 835 840 845  
 Asp Tyr Glu Ser Phe Ser Cys Val Cys Pro Thr Gly Trp Gln Gly Gln  
 850 855 860  
 Thr Cys Glu Ile Asp Ile Asn Glu Cys Val Lys Ser Pro Cys Arg His  
 865 870 875 880  
 Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Gln  
 885 890 895  
 Ala Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Glu Ser Asp Ile Asp Asp Cys Arg  
 900 905 910  
 Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Gly Val Asn Ala  
 915 920 925  
 Ala Phe Cys Asp Cys Leu Pro Gly Phe Gln Gly Ala Phe Cys Glu Glu  
 930 935 940  
 Asp Ile Asn Glu Cys Ala Thr Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala Asn Cys  
 945 950 955 960  
 Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Thr Gly Phe Asn  
 965 970 975  
 Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys  
 980 985 990

ES 2 532 405 T3

Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu  
 995 1000 1005  
 Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln Tyr Asp Val Asn  
 1010 1015 1020  
 Glu Cys Asp Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp  
 1025 1030 1035  
 Ser Tyr Gly Thr Tyr Lys Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly  
 1040 1045 1050  
 Leu Asn Cys Gln Asn Leu Val Arg Trp Cys Asp Ser Ala Pro Cys  
 1055 1060 1065  
 Lys Asn Gly Gly Lys Cys Trp Gln Thr Asn Thr Gln Tyr His Cys  
 1070 1075 1080  
 Glu Cys Arg Ser Gly Trp Thr Gly Phe Asn Cys Asp Val Leu Ser  
 1085 1090 1095  
 Val Ser Cys Glu Val Ala Ala Gln Lys Arg Gly Ile Asp Val Thr  
 1100 1105 1110  
 Leu Leu Cys Gln His Gly Gly Leu Cys Val Asp Glu Glu Asp Lys  
 1115 1120 1125  
 His Tyr Cys His Cys Gln Ala Gly Tyr Thr Gly Ser Tyr Cys Glu  
 1130 1135 1140  
 Asp Glu Val Asp Glu Cys Ser Pro Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala  
 1145 1150 1155  
 Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Phe Ser Cys Lys Cys Val Ala  
 1160 1165 1170  
 Gly Tyr His Gly Ser Asn Cys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Cys Leu  
 1175 1180 1185  
 Ser Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ile Asp Leu Thr Asn  
 1190 1195 1200  
 Thr Tyr Lys Cys Ser Cys Pro Arg Gly Thr Gln Gly Val His Cys  
 1205 1210 1215  
 Glu Ile Asn Val Asp Asp Cys His Pro Pro Leu Asp Pro Ala Ser  
 1220 1225 1230  
 Arg Ser Pro Lys Cys Phe Asn Asn Gly Thr Cys Val Asp Gln Val



ES 2 532 405 T3

Met Pro Ala Leu Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala Leu Leu Trp Leu Trp  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Ala Gly Pro Ala His Ala Leu Gln Cys Arg Gly Gly Gln  
 20 25 30  
 Glu Pro Cys Val Asn Glu Gly Thr Cys Val Thr Tyr His Asn Gly Thr  
 35 40 45  
 Gly Tyr Cys Arg Cys Pro Glu Gly Phe Leu Gly Glu Tyr Cys Gln His  
 50 55 60  
 Arg Asp Pro Cys Glu Lys Asn Arg Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Val  
 65 70 75 80  
 Thr Gln Ala Met Leu Gly Lys Ala Thr Cys Arg Cys Ala Pro Gly Phe  
 85 90 95  
 Thr Gly Glu Asp Cys Gln Tyr Ser Thr Ser His Pro Cys Phe Val Ser  
 100 105 110  
 Arg Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Met Leu Ser Trp Asp Thr  
 115 120 125  
 Tyr Glu Cys Thr Cys Gln Val Gly Phe Thr Gly Lys Gln Cys Gln Trp  
 130 135 140  
 Thr Asp Val Cys Leu Ser His Pro Cys Glu Asn Gly Ser Thr Cys Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Val Ala Asn Gln Phe Ser Cys Arg Cys Pro Ala Gly Ile Thr Gly  
 165 170 175  
 Gln Lys Cys Asp Ala Asp Ile Asn Glu Cys Asp Ile Pro Gly Arg Cys  
 180 185 190  
 Gln His Gly Gly Thr Cys Leu Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Gln  
 195 200 205  
 Cys Pro Gln Arg Phe Thr Gly Gln His Cys Asp Ser Pro Tyr Val Pro  
 210 215 220  
 Cys Ala Pro Ser Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys Arg Gln Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Asp Phe Thr Ser Glu Cys His Cys Leu Pro Gly Phe Glu Gly Ser Asn



ES 2 532 405 T3

Val Asn Arg Phe Gln Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Pro Val  
 515 520 525  
 Cys Gln Ile Asp Ile Asp Asp Cys Ser Ser Thr Pro Cys Leu Asn Gly  
 530 535 540  
 Ala Lys Cys Ile Asp His Pro Asn Gly Tyr Glu Cys Gln Cys Ala Thr  
 545 550 555 560  
 Gly Phe Thr Gly Thr Leu Cys Asp Glu Asn Ile Asp Asn Cys Asp Pro  
 565 570 575  
 Asp Pro Cys His His Gly Gln Cys Gln Asp Gly Ile Asp Ser Tyr Thr  
 580 585 590  
 Cys Ile Cys Asn Pro Gly Tyr Met Gly Ala Ile Cys Ser Asp Gln Ile  
 595 600 605  
 Asp Glu Cys Tyr Ser Ser Pro Cys Leu Asn Asp Gly Arg Cys Ile Asp  
 610 615 620  
 Leu Val Asn Gly Tyr Gln Cys Asn Cys Gln Pro Gly Thr Ser Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Asn Cys Glu Ile Asn Phe Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Leu His  
 645 650 655  
 Gly Ala Cys Val Asp Gly Ile Asn Arg Tyr Ser Cys Val Cys Ser Pro  
 660 665 670  
 Gly Phe Thr Gly Gln Arg Cys Asn Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser  
 675 680 685  
 Asn Pro Cys Arg Lys Asp Ala Thr Cys Ile Asn Asp Val Asn Gly Phe  
 690 695 700  
 Arg Cys Met Cys Pro Glu Gly Pro His His Pro Ser Cys Tyr Ser Gln  
 705 710 715 720  
 Val Asn Glu Cys Leu Ser Ser Pro Cys Ile His Gly Asn Cys Thr Gly  
 725 730 735  
 Gly Leu Ser Gly Tyr Lys Cys Leu Cys Asp Ala Gly Trp Val Gly Ile  
 740 745 750  
 Asn Cys Glu Val Asp Lys Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Gln Asn  
 755 760 765  
 Gly Gly Thr Cys Asn Asn Leu Val Asn Gly Tyr Arg Cys Thr Cys Lys  
 770 775 780

ES 2 532 405 T3

Lys Gly Phe Lys Gly Tyr Asn Cys Gln Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala  
 785 790 795 800  
 Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gln Gly Thr Cys Leu Asp Asp Val Ser Gly  
 805 810 815  
 Tyr Thr Cys His Cys Met Leu Pro Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr  
 820 825 830  
 Val Leu Ala Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Glu Asn Ala Ala Val Cys  
 835 840 845  
 Lys Glu Ala Pro Asn Phe Glu Ser Phe Thr Cys Leu Cys Ala Pro Gly  
 850 855 860  
 Trp Gln Gly Gln Arg Cys Thr Val Asp Val Asp Glu Cys Val Ser Lys  
 865 870 875  
 Pro Cys Met Asn Asn Gly Ile Cys His Asn Thr Gln Gly Ser Tyr Met  
 885 890 895  
 Cys Glu Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Met Asp Cys Glu Glu Asp Ile  
 900 905 910  
 Asn Asp Cys Leu Ala Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Val Asp  
 915 920 925  
 Lys Val Asn Thr Phe Ser Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Val Gly Asp  
 930 935 940  
 Lys Cys Gln Thr Asp Met Asn Glu Cys Leu Ser Glu Pro Cys Lys Asn  
 945 950 955 960  
 Gly Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Val Asn Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro  
 965 970 975  
 Ala Gly Phe His Gly Val His Cys Glu Asn Asn Ile Asp Glu Cys Thr  
 980 985 990  
 Glu Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser  
 995 1000 1005  
 Phe Ser Cys Leu Cys Pro Val Gly Phe Thr Gly Pro Phe Cys Leu  
 1010 1015 1020  
 His Asp Ile Asn Glu Cys Ser Ser Asn Pro Cys Leu Asn Ser Gly  
 1025 1030 1035  
 Thr Cys Val Asp Gly Leu Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Cys Pro Leu  
 1040 1045 1050

ES 2 532 405 T3

Gly Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr Leu Val Asn Leu Cys Ser  
 1055 1060 1065

Pro Ser Pro Cys Lys Asn Lys Gly Thr Cys Ala Gln Glu Lys Ala  
 1070 1075 1080

Arg Pro Arg Cys Leu Cys Pro Pro Gly Trp Asp Gly Ala Tyr Cys  
 1085 1090 1095

Asp Val Leu Asn Val Ser Cys Lys Ala Ala Ala Leu Gln Lys Gly  
 1100 1105 1110

Val Pro Val Glu His Leu Cys Gln His Ser Gly Ile Cys Ile Asn  
 1115 1120 1125

Ala Gly Asn Thr His His Cys Gln Cys Pro Leu Gly Tyr Thr Gly  
 1130 1135 1140

Ser Tyr Cys Glu Glu Gln Leu Asp Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys  
 1145 1150 1155

Gln His Gly Ala Thr Cys Ser Asp Phe Ile Gly Gly Tyr Arg Cys  
 1160 1165 1170

Glu Cys Val Pro Gly Tyr Gln Gly Val Asn Cys Glu Tyr Glu Val  
 1175 1180 1185

Asp Glu Cys Gln Asn Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ile  
 1190 1195 1200

Asp Leu Val Asn His Phe Lys Cys Ser Cys Pro Pro Gly Thr Arg  
 1205 1210 1215

Gly Leu Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Gly Ala Pro  
 1220 1225 1230

His Cys Leu Asn Gly Gly Gln Cys Val Asp Arg Ile Gly Gly Tyr  
 1235 1240 1245

Ser Cys Arg Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Glu Arg Cys Glu Gly  
 1250 1255 1260

Asp Ile Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ser Ser Glu Gly Ser  
 1265 1270 1275

Leu Asp Cys Ile Gln Leu Lys Asn Asn Tyr Gln Cys Val Cys Arg  
 1280 1285 1290

Ser Ala Phe Thr Gly Arg His Cys Glu Thr Phe Leu Asp Val Cys



ES 2 532 405 T3

| 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Gln | Gly | Pro | Asp | Cys | Ser | Gln | Pro | Asp | Pro | Cys | Val | Ser | Arg | Pro |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Cys | Val | His | Gly | Ala | Pro | Cys | Ser | Val | Gly | Pro | Asp | Gly | Arg | Phe | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Cys | Ala | Cys | Pro | Pro | Gly | Tyr | Gln | Gly | Gln | Ser | Cys | Gln | Ser | Asp | Ile |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Glu | Cys | Arg | Ser | Gly | Thr | Thr | Cys | Arg | His | Gly | Gly | Thr | Cys | Leu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asn | Thr | Pro | Gly | Ser | Phe | Arg | Cys | Gln | Cys | Pro | Leu | Gly | Tyr | Thr | Gly |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Leu | Leu | Cys | Glu | Asn | Pro | Val | Val | Pro | Cys | Ala | Pro | Ser | Pro | Cys | Arg |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asn | Gly | Gly | Thr | Cys | Arg | Gln | Ser | Ser | Asp | Val | Thr | Tyr | Asp | Cys | Ala |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Cys | Leu | Pro | Gly | Phe | Glu | Gly | Gln | Asn | Cys | Glu | Val | Asn | Val | Asp | Asp |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Cys | Pro | Gly | His | Arg | Cys | Leu | Asn | Gly | Gly | Thr | Cys | Val | Asp | Gly | Val |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Asn | Thr | Tyr | Asn | Cys | Gln | Cys | Pro | Pro | Glu | Trp | Thr | Gly | Gln | Phe | Cys |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Thr | Glu | Asp | Val | Asp | Glu | Cys | Gln | Leu | Gln | Pro | Asn | Ala | Cys | His | Asn |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Gly | Gly | Thr | Cys | Phe | Asn | Leu | Leu | Gly | Gly | His | Ser | Cys | Val | Cys | Val |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Asn | Gly | Trp | Thr | Gly | Glu | Ser | Cys | Ser | Gln | Asn | Ile | Asp | Asp | Cys | Ala |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Thr | Ala | Val | Cys | Phe | His | Gly | Ala | Thr | Cys | His | Asp | Arg | Val | Ala | Ser |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Phe | Tyr | Cys | Ala | Cys | Pro | Met | Gly | Lys | Thr | Gly | Leu | Leu | Cys | His | Leu |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Asp | Asp | Ala | Cys | Val | Ser | Asn | Pro | Cys | His | Glu | Asp | Ala | Ile | Cys | Asp |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |

ES 2 532 405 T3

Thr Asn Pro Val Ser Gly Arg Ala Ile Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe  
 370 375 380  
 Thr Gly Gly Ala Cys Asp Gln Asp Val Asp Glu Cys Ser Ile Gly Ala  
 385 390 395 400  
 Asn Pro Cys Glu His Leu Gly Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Ser Phe  
 405 410 415  
 Leu Cys Gln Cys Gly Arg Gly Tyr Thr Gly Pro Arg Cys Glu Thr Asp  
 420 425 430  
 Val Asn Glu Cys Leu Ser Gly Pro Cys Arg Asn Gln Ala Thr Cys Leu  
 435 440 445  
 Asp Arg Ile Gly Gln Phe Thr Cys Ile Cys Met Ala Gly Phe Thr Gly  
 450 455 460  
 Thr Tyr Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Gln Ser Ser Pro Cys Val  
 465 470 475 480  
 Asn Gly Gly Val Cys Lys Asp Arg Val Asn Gly Phe Ser Cys Thr Cys  
 485 490 495  
 Pro Ser Gly Phe Ser Gly Ser Met Cys Gln Leu Asp Val Asp Glu Cys  
 500 505 510  
 Ala Ser Thr Pro Cys Arg Asn Gly Ala Lys Cys Val Asp Gln Pro Asp  
 515 520 525  
 Gly Tyr Glu Cys Arg Cys Ala Glu Gly Phe Glu Gly Thr Leu Cys Glu  
 530 535 540  
 Arg Asn Val Asp Asp Cys Ser Pro Asp Pro Cys His His Gly Arg Cys  
 545 550 555 560  
 Val Asp Gly Ile Ala Ser Phe Ser Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Thr  
 565 570 575  
 Gly Ile Arg Cys Glu Ser Gln Val Asp Glu Cys Arg Ser Gln Pro Cys  
 580 585 590  
 Arg Tyr Gly Gly Lys Cys Leu Asp Leu Val Asp Lys Tyr Leu Cys Arg  
 595 600 605  
 Cys Pro Pro Gly Thr Thr Gly Val Asn Cys Glu Val Asn Ile Asp Asp  
 610 615 620  
 Cys Ala Ser Asn Pro Cys Thr Phe Gly Val Cys Arg Asp Gly Ile Asn  
 625 630 635 640

ES 2 532 405 T3

Arg Tyr Asp Cys Val Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Pro Leu Cys Asn  
 645 650 655  
 Val Glu Ile Asn Glu Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gly Glu Gly Gly Ser  
 660 665 670  
 Cys Val Asp Gly Glu Asn Gly Phe His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Ser  
 675 680 685  
 Leu Pro Pro Leu Cys Leu Pro Ala Asn His Pro Cys Ala His Lys Pro  
 690 700  
 Cys Ser His Gly Val Cys His Asp Ala Pro Gly Gly Phe Arg Cys Val  
 705 710 715 720  
 Cys Glu Pro Gly Trp Ser Gly Pro Arg Cys Ser Gln Ser Leu Ala Pro  
 725 730 735  
 Asp Ala Cys Glu Ser Gln Pro Cys Gln Ala Gly Gly Thr Cys Thr Ser  
 740 745 750  
 Asp Gly Ile Gly Phe Arg Cys Thr Cys Ala Pro Gly Phe Gln Gly His  
 755 760 765  
 Gln Cys Glu Val Leu Ser Pro Cys Thr Pro Ser Leu Cys Glu His Gly  
 770 775 780  
 Gly His Cys Glu Ser Asp Pro Asp Arg Leu Thr Val Cys Ser Cys Pro  
 785 790 795 800  
 Pro Gly Trp Gln Gly Pro Arg Cys Gln Gln Asp Val Asp Glu Cys Ala  
 805 810 815  
 Gly Ala Ser Pro Cys Gly Pro His Gly Thr Cys Thr Asn Leu Pro Gly  
 820 825 830  
 Asn Phe Arg Cys Ile Cys His Arg Gly Tyr Thr Gly Pro Phe Cys Asp  
 835 840 845  
 Gln Asp Ile Asp Asp Cys Asp Pro Asn Pro Cys Leu His Gly Gly Ser  
 850 855 860  
 Cys Gln Asp Gly Val Gly Ser Phe Ser Cys Ser Cys Leu Asp Gly Phe  
 865 870 875 880  
 Ala Gly Pro Arg Cys Ala Arg Asp Val Asp Glu Cys Leu Ser Ser Pro  
 885 890 895  
 Cys Gly Pro Gly Thr Cys Thr Asp His Val Ala Ser Phe Thr Cys Ala  
 900 905 910

ES 2 532 405 T3

Cys Pro Pro Gly Tyr Gly Gly Phe His Cys Glu Ile Asp Leu Pro Asp  
 915 920 925  
 Cys Ser Pro Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Val  
 930 935 940  
 Ser Ser Phe Ser Cys Leu Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Thr His Cys  
 945 950 955 960  
 Gln Tyr Glu Ala Asp Pro Cys Phe Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly  
 965 970 975  
 Ile Cys Asn Pro Thr His Pro Gly Phe Glu Cys Thr Cys Arg Glu Gly  
 980 985 990  
 Phe Thr Gly Ser Gln Cys Gln Asn Pro Val Asp Trp Cys Ser Gln Ala  
 995 1000 1005  
 Pro Cys Gln Asn Gly Gly Arg Cys Val Gln Thr Gly Ala Tyr Cys  
 1010 1015 1020  
 Ile Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Arg Leu Cys Asp Ile Gln Ser  
 1025 1030 1035  
 Leu Pro Cys Thr Glu Ala Ala Ala Gln Met Gly Val Arg Leu Glu  
 1040 1045 1050  
 Gln Leu Cys Gln Glu Gly Gly Lys Cys Ile Asp Lys Gly Arg Ser  
 1055 1060 1065  
 His Tyr Cys Val Cys Pro Glu Gly Arg Thr Gly Ser His Cys Glu  
 1070 1075 1080  
 His Glu Val Asp Pro Cys Thr Ala Gln Pro Cys Gln His Gly Gly  
 1085 1090 1095  
 Thr Cys Arg Gly Tyr Met Gly Gly Tyr Val Cys Glu Cys Pro Ala  
 1100 1105 1110  
 Gly Tyr Ala Gly Asp Ser Cys Glu Asp Asn Ile Asp Glu Cys Ala  
 1115 1120 1125  
 Ser Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Ile Asp Leu Val Ala  
 1130 1135 1140  
 Arg Tyr Leu Cys Ser Cys Pro Pro Gly Thr Leu Gly Val Leu Cys  
 1145 1150 1155  
 Glu Ile Asn Glu Asp Asp Cys Asp Leu Gly Pro Ser Leu Asp Ser

ES 2 532 405 T3

|              |                 |          |                 |                      |
|--------------|-----------------|----------|-----------------|----------------------|
| 1160         |                 | 1165     |                 | 1170                 |
| Gly Val 1175 | Gln Cys Leu His | Asn 1180 | Gly Thr Cys Val | Asp 1185 Leu Val Gly |
| Gly Phe 1190 | Arg Cys Asn Cys | Pro 1195 | Pro Gly Tyr Thr | Gly 1200 Leu His Cys |
| Glu Ala 1205 | Asp Ile Asn Glu | Cys 1210 | Arg Pro Gly Ala | Cys 1215 His Ala Ala |
| His Thr 1220 | Arg Asp Cys Leu | Gln 1225 | Asp Pro Gly Gly | His 1230 Phe Arg Cys |
| Val Cys 1235 | His Pro Gly Phe | Thr 1240 | Gly Pro Arg Cys | Gln 1245 Ile Ala Leu |
| Ser Pro 1250 | Cys Glu Ser Gln | Pro 1255 | Cys Gln His Gly | Gly 1260 Gln Cys Arg |
| His Ser 1265 | Leu Gly Arg Gly | Gly 1270 | Gly Leu Thr Phe | Thr 1275 Cys His Cys |
| Val Pro 1280 | Pro Phe Trp Gly | Leu 1285 | Arg Cys Glu Arg | Val 1290 Ala Arg Ser |
| Cys Arg 1295 | Glu Leu Gln Cys | Pro 1300 | Val Gly Ile Pro | Cys 1305 Gln Gln Thr |
| Ala Arg 1310 | Gly Pro Arg Cys | Ala 1315 | Cys Pro Pro Gly | Leu 1320 Ser Gly Pro |
| Ser Cys 1325 | Arg Val Ser Arg | Ala 1330 | Ser Pro Ser Gly | Ala 1335 Thr Asn Ala |
| Ser Cys 1340 | Ala Ser Ala Pro | Cys 1345 | Leu His Gly Gly | Ser 1350 Cys Leu Pro |
| Val Gln 1355 | Ser Val Pro Phe | Phe 1360 | Arg Cys Val Cys | Ala 1365 Pro Gly Trp |
| Gly Gly 1370 | Pro Arg Cys Glu | Thr 1375 | Pro Ser Ala Ala |                      |

<210> 5  
 <211> 1170  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 5

10 Met Gln Pro Gln Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Asn Phe Pro



ES 2 532 405 T3

Asn Pro Asp Asp Cys Val Arg His Gln Cys Gln Asn Gly Ala Thr Cys  
 275 280 285  
 Leu Asp Gly Leu Asp Thr Tyr Thr Cys Leu Cys Pro Lys Thr Trp Lys  
 290 295 300  
 Gly Trp Asp Cys Ser Glu Asp Ile Asp Glu Cys Glu Ala Arg Gly Pro  
 305 310 315 320  
 Pro Arg Cys Arg Asn Gly Gly Thr Cys Gln Asn Thr Ala Gly Ser Phe  
 325 330 335  
 His Cys Val Cys Val Ser Gly Trp Gly Gly Ala Gly Cys Glu Glu Asn  
 340 345 350  
 Leu Asp Asp Cys Ala Ala Ala Thr Cys Ala Pro Gly Ser Thr Cys Ile  
 355 360 365  
 Asp Arg Val Gly Ser Phe Ser Cys Leu Cys Pro Pro Gly Arg Thr Gly  
 370 375 380  
 Leu Leu Cys His Leu Glu Asp Met Cys Leu Ser Gln Pro Cys His Val  
 385 390 395 400  
 Asn Ala Gln Cys Ser Thr Asn Pro Leu Thr Gly Ser Thr Leu Cys Ile  
 405 410 415  
 Cys Gln Pro Gly Tyr Ser Gly Ser Thr Cys His Gln Asp Leu Asp Glu  
 420 425 430  
 Cys Gln Met Ala Gln Gln Gly Pro Ser Pro Cys Glu His Gly Gly Ser  
 435 440 445  
 Cys Ile Asn Thr Pro Gly Ser Phe Asn Cys Leu Cys Leu Pro Gly Tyr  
 450 455 460  
 Thr Gly Ser Arg Cys Glu Ala Asp His Asn Glu Cys Leu Ser Gln Pro  
 465 470 475 480  
 Cys His Pro Gly Ser Thr Cys Leu Asp Leu Leu Ala Thr Phe His Cys  
 485 490 495  
 Leu Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Arg Leu Cys Glu Val Glu Val Asn  
 500 505 510  
 Glu Cys Thr Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gln Ala Ala Cys His Asp Leu  
 515 520 525  
 Leu Asn Gly Phe Gln Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg  
 530 535 540

ES 2 532 405 T3

Cys Glu Lys Asp Met Asp Glu Cys Ser Ser Thr Pro Cys Ala Asn Gly  
 545 550 555 560  
 Gly Arg Cys Arg Asp Gln Pro Gly Ala Phe Tyr Cys Glu Cys Leu Pro  
 565 570 575  
 Gly Phe Glu Gly Pro His Cys Glu Lys Glu Val Asp Glu Cys Leu Ser  
 580 585 590  
 Asp Pro Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys Leu Asp Leu Pro Gly Ala Phe  
 595 600 605  
 Phe Cys Leu Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Gln Leu Cys Glu Val Pro  
 610 615 620  
 Leu Cys Thr Pro Asn Met Cys Gln Pro Gly Gln Gln Cys Gln Gly Gln  
 625 630 635 640  
 Glu His Arg Ala Pro Cys Leu Cys Pro Asp Gly Ser Pro Gly Cys Val  
 645 650 655  
 Pro Ala Glu Asp Asn Cys Pro Cys His His Gly His Cys Gln Arg Ser  
 660 665 670  
 Leu Cys Val Cys Asp Glu Gly Trp Thr Gly Pro Glu Cys Glu Thr Glu  
 675 680 685  
 Leu Gly Gly Cys Ile Ser Thr Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His  
 690 695 700  
 Pro Gln Pro Ser Gly Tyr Asn Cys Thr Cys Pro Ala Gly Tyr Met Gly  
 705 710 715 720  
 Leu Thr Cys Ser Glu Glu Val Thr Ala Cys His Ser Gly Pro Cys Leu  
 725 730 735  
 Asn Gly Gly Ser Cys Ser Ile Arg Pro Glu Gly Tyr Ser Cys Thr Cys  
 740 745 750  
 Leu Pro Ser His Thr Gly Arg His Cys Gln Thr Ala Val Asp His Cys  
 755 760 765  
 Val Ser Ala Ser Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Asn Lys Pro Gly  
 770 775 780  
 Thr Phe Phe Cys Leu Cys Ala Thr Gly Phe Gln Gly Leu His Cys Glu  
 785 790 795 800  
 Glu Lys Thr Asn Pro Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Arg Asn Lys Ala  
 805 810 815

ES 2 532 405 T3

Thr Cys Gln Asp Thr Pro Arg Gly Ala Arg Cys Leu Cys Ser Pro Gly  
 820 825 830  
 Tyr Thr Gly Ser Ser Cys Gln Thr Leu Ile Asp Leu Cys Ala Arg Lys  
 835 840 845  
 Pro Cys Pro His Thr Ala Arg Cys Leu Gln Ser Gly Pro Ser Phe Gln  
 850 855 860  
 Cys Leu Cys Leu Gln Gly Trp Thr Gly Ala Leu Cys Asp Phe Pro Leu  
 865 870 875 880  
 Ser Cys Gln Lys Ala Ala Met Ser Gln Gly Ile Glu Ile Ser Gly Leu  
 885 890 895  
 Cys Gln Asn Gly Gly Leu Cys Ile Asp Thr Gly Ser Ser Tyr Phe Cys  
 900 905 910  
 Arg Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Lys Leu Cys Gln Asp Asn Val Asn  
 915 920 925  
 Pro Cys Glu Pro Asn Pro Cys His His Gly Ser Thr Cys Val Pro Gln  
 930 935 940  
 Pro Ser Gly Tyr Val Cys Gln Cys Ala Pro Gly Tyr Glu Gly Gln Asn  
 945 950 955 960  
 Cys Ser Lys Val Leu Asp Ala Cys Gln Ser Gln Pro Cys His Asn His  
 965 970 975  
 Gly Thr Cys Thr Ser Arg Pro Gly Gly Phe His Cys Ala Cys Pro Pro  
 980 985 990  
 Gly Phe Val Gly Leu Arg Cys Glu Gly Asp Val Asp Glu Cys Leu Asp  
 995 1000 1005  
 Arg Pro Cys His Pro Ser Gly Thr Ala Ala Cys His Ser Leu Ala  
 1010 1015 1020  
 Asn Ala Phe Tyr Cys Gln Cys Leu Pro Gly His Thr Gly Gln Arg  
 1025 1030 1035  
 Cys Glu Val Glu Met Asp Leu Cys Gln Ser Gln Pro Cys Ser Asn  
 1040 1045 1050  
 Gly Gly Ser Cys Glu Ile Thr Thr Gly Pro Pro Pro Gly Phe Thr  
 1055 1060 1065  
 Cys His Cys Pro Lys Gly Phe Glu Gly Pro Thr Cys Ser His Lys



ES 2 532 405 T3

gcctgttttc aggggtgccac ctgccatgac cgtgtggctt ccttctactg cgagtgtcca 1080  
catgggcgca caggcctgct gtgccacctg aacgatgctg gtatcagcaa cccctgcaac 1140  
gagggtcca actgcgacac caaccctgtc aacggcaagg ccatctgcac ttgcccctcg 1200  
gggtacacgg ggccagcctg cagccaggac gtggatgagt gcgctctagg tgccaacccg 1260  
tgtgagcacg cgggcaagtg cctcaacaca ctgggctctt tcgagtgtca gtgtctacag 1320  
ggctacactg ggccccgctg tgagattgat gtcaacgagt gcatctcaa cccatgtcag 1380  
aatgatgcca cgtgcctgga ccagattggg gagtttcagt gtatatgtat gccaggttat 1440  
gagggtgtat actgtgagat caacacggac gagtgtgcca gcagcccctg tctacacaat 1500  
ggccgctgcg tggacaagat caacgagttc ctgtgtcagt gtcccaaagg cttcagcggg 1560  
cacctgtgcc agtatgacgt ggatgagtgc gccagcacac catgcaagaa cggcgccaag 1620  
tgcctggatg ggcccaacac ctacacctgc gtgtgcacag aaggttacac ggggaccac 1680  
tgcgaggtag acattgacga gtgtgacct gaccctgtc actatggtt gtgcaaggat 1740  
ggtgtggcca ctttacctg cctctgccag ccaggctaca caggccatca ctgtgagacc 1800  
aacattaatg agtgtcacag ccagccgtgc cgccatggcg gcacctgcca ggaccgtgac 1860  
aactactacc tctgcttatg cctcaagggg accacaggac ccaactgtga gatcaatctg 1920  
gatgactgtg cgagcaaccc ctgtgactct ggcacgtgtc tggacaagat cgatggctac 1980  
gagtgtgctg cgcgagccagg ctacacaggg agcatgtgta atgtcaacat tgacgaatgt 2040  
gcgggcagcc cctgccaaa cgggggcacc tgtgaggatg gcatcgccgg cttcacttgc 2100  
cgctgccccg agggctacca cgaccctacg tgctgtctg aggtcaacga gtgcaacagt 2160  
aaccctgca tccatggagc ttgccgggat ggcctcaatg gatacaaatg tgactgtgcc 2220  
cctgggtgga gtgggacaaa ctgtgacatc aacaacaatg agtgtgagtc caaccctgt 2280  
gtcaacgggtg gcacctgcaa agacatgacc agtggctacg tatgcacctg ccgagaaggc 2340  
ttcagtggcc ctaactgcca gaccaacatt aacgaatgtg cttccaaccc ctgcctgaac 2400  
cagggcacct gcattgatga tgtcgctggg taaaaatgca actgccctct gccctataca 2460  
ggagccacat gtgaggtggt gttggcccca tgtgccacca gccctgcaa aaacagtggg 2520  
gtatgcaagg agtctgagga ctatgagagc ttttcctgtg tctgtcccac aggctggcaa 2580  
ggtcaaacct cgcgagatcga catcaatgag tgtgtgaaaa gccctgtctg ccatggtgcc 2640  
tcttgccaga acaccaatgg cagctaccgc tgctctgccc aggttggtta cacgggtcgc 2700  
aactgcgaga gtgacatcga tgactgccga cccaacccat gtcacaacgg gggttcctgc 2760  
actgacgggg tcaacgcggc cttctgcgac tgctgcccc gcttccaggg tgccttctgt 2820  
gaggaggaca tcaacgaatg cgccagcaat ccatgcaaaa atggcgcaa ctgactgac 2880  
tgcgtggaca gctacacgtg cacctgcccc acgggcttca atggcatcca ttgcgagaac 2940  
aacacacctg actgtaccga gagctcctgt ttcaatggtg gcacctgtgt ggatggtatc 3000  
aactccttca cctgtctgtg cccacctggc ttacgggca gctactgcca gtatgacgtc 3060

ES 2 532 405 T3

aatgagtgtg actcacggcc ctgtctgcat ggtggcacct gccaaagacag ctatggtacc 3120  
 tataagtgtg cctgcccaca gggctacact ggtctcaact gccagaacct tgtgcgctgg 3180  
 tgtgactcag ctccctgcaa gaatggcggc aagtgtctggc agaccaacac acagtaccac 3240  
 tgcgagtgcc gcagcggctg gactggcttc aactgcgacg tgctcagtgt gtcctgcgag 3300  
 gtggctgcac agaagcgagg catcgatgtc actctctat gccagcacgg agggctctgt 3360  
 gtggatgagg aagacaagca ttactgccac tgccaggcag gatacacggg cagctactgt 3420  
 gaggacgagg tggacgagtg ctcacctaata cctgcccaga acggagccac ctgcaactgac 3480  
 tatctcggtg gcttttctg caagtgtgtg gctgggtacc atggctctaa ctgctctgag 3540  
 gagatcaacg agtgcctatc ccaaccctgc cagaatgggg gtacctgcat tgatctgacc 3600  
 aacacctaca agtgcctctg ccccaggggc acacagggtg taaactgtga gatcaacgtc 3660  
 gatgactgcc atcctcccct agaccctgt tcccgaagcc ccaaagtct caataatggc 3720  
 acctgcgtgg accaggtggg tggctatacc tgcacctgcc cggcaggctt cgtcggggag 3780  
 cgggtgcgagg gcgatgtcaa tgagtgtctc tccaaccct gtgaccacg tggcaccag 3840  
 aactgcgtgc agcgtgttaa tgacttccac tgcgagtgcc gggctggcca cactggacgc 3900  
 cgctgtgagt cggctattaa tggctgcagg ggcaaacat gcaggaatgg aggtgtctgt 3960  
 gctgtggcct ccaacaccgc ccgtggattc atctgtaggt gccctgctgg cttcgagggt 4020  
 gccactgtg aaaatgacgc ccgcactgt ggcagtttg gctgcctcaa cgggtgttacg 4080  
 tgcactcag gccacgcag tcccactgc ctatgcctgg gctccttac tggcctgaa 4140  
 tgccagtcc cagccagcag cccctgtgtg ggtagcaacc cctgtacaa tcagggcacc 4200  
 tgtgagcca catccgagag ccctttctac cgctgtctat gccctgcaa attcaacggg 4260  
 ctgctgtgcc acatcctgga ctacagcttc aca 4293

<210> 7  
 <211> 4257  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 7

atgcccgtc tgcgtcccgc cgcgctgcgg gcgctgtgt ggctctggct gtgcggcgcg 60  
 ggccccgcgc acgctttgca gtgtcgaggt ggtcaagagc cctgtgtaaa tgaggggacc 120  
 tgtgttacct accacaacgg cacaggctac tgccgatgtc cagagggctt cttgggagaa 180  
 tattgtcaac atcgagacc ttgtgagaag aaccgctgtc agaatggtgg tacttgtgtg 240  
 acgcaggcca tgttgggaaa agccacctgt cgatgtgctc cagggttcac aggggaggac 300  
 tgccaatact cgacctctca cccctgtttt gtttcccgcc cctgtcagaa tggaggtacc 360  
 tgccacatgc tcagctggga cacctatgag tgcacctgtc aagttggctt cacaggaaag 420  
 cagtgtcagt ggacagatgt ctgtctgtct catccctgtg aaaatggaag cacctgtagc 480  
 tctgtggcca accagttctc ctgcagatgt cctgcaggca tcacaggcca gaagtgtgac 540

10

ES 2 532 405 T3

|  |      |
|--|------|
| gccgacatca atgaatgtga cattccagga cgctgccaac atggtggcac ctgcctcaac  | 600  |
| cttcctgggt cctaccgatg ccaatgccct cagcggttca caggccagca ctgtgacagc  | 660  |
| ccttacgtgc cctgtgcacc ctcaccctgc gtcaatggag gcacctgccg tcagactgga  | 720  |
| gacttcactt ctgaatgcca ttgcctgcca ggctttgaag ggagcaactg cgagcggaat  | 780  |
| atcgacgact gccctaacca caagtgtcag aatggagggg tgtgtgtgga tggcgtcaat  | 840  |
| acttacaact gccgctgccc ccctcagtgg actgggcagt tctgcacaga agacgtggat  | 900  |
| gagtgtctgc tgcagcccaa tgcttgtcag aatggaggca cttgcaccaa ccgcaacgga  | 960  |
| ggctacggct gcgtgtgctg gaacggctgg agtggggatg actgcagcga gaacatcgat  | 1020 |
| gactgtgcct tcgcttcctg cacgccaggc tccacctgta ttgaccgtgt ggcctccttc  | 1080 |
| tcctgccttt gtccagaggg aaaggcaggg ctctgtgtc atctggatga tgcctgtatc   | 1140 |
| agcaaccctt gtcacaaggg ggcgctgtgt gataccaacc ccctgaatgg gcagtacatt  | 1200 |
| tgcacctgcc cacaggcgta caagggcgct gactgcacag aagacgtgga tgagtgtgct  | 1260 |
| atggccaaca gtaacccttg tgagcatgca ggaaagtgtg tgaatacaga tggcgccttc  | 1320 |
| cactgcgagt gtctgaaggg ctacgcaggg cctcgtgtg agatggacat caacgagtgt   | 1380 |
| cactcagacc cctgtcagaa cgacgccacc tgcctggata agattggagg cttcacctgt  | 1440 |
| ctctgcatgc cgggtttcaa aggtgtgcat tgtgaactgg aggtgaatga atgccagagc  | 1500 |
| aaccctgtgt taaacaatgg gcagtgtgtg gacaaagtca atcgcttcca gtgtctgtgt  | 1560 |
| ccccctggtt tcacaggacc agtgtgccag atcgacattg acgactgctc cagtactccc  | 1620 |
| tgcctgaatg gggccaagtg catcgatcac ccgaatggct atgaatgcca gtgtgccaca  | 1680 |
| ggattcactg gcacactgtg tgatgagaac atcgacaact gtgacccgga tccttgccac  | 1740 |
| catggccagt gccaggatgg gattgactcc tacacctgca tctgcaaccc cgggtacatg  | 1800 |
| ggagccatct gtagtgacca gattgatgaa tgctacagca gcccctgcct gaatgatgga  | 1860 |
| cgctgcatcg acctggtgaa cggctaccag tgcaactgcc aaccgggtac ctcaggcctt  | 1920 |
| aattgtgaaa ttaattttga tgactgtgcc agcaaccctt gtctgcacgg agcctgtgtg  | 1980 |
| gacggcatca accgttacag ttgtgtgtgc tctccgggat tcacagggca gaggtgcaac  | 2040 |
| atagacattg atgagtgtgc ctccaacccc tgtcgcaagg atgcgacgtg catcaatgac  | 2100 |
| gtgaatgggt tccgggtgat gtgccctgag ggaccacacc atcccagctg ctactcacag  | 2160 |
| gtgaacgagt gtttgagcag tcctgcatc catggaaact gtactggagg tctcagtggc   | 2220 |
| tataagtgcc tctgcatgc aggctgggtt ggtatcaact gcgaagtgga caaaaatgag   | 2280 |
| tgtctttcta acccgtgcca gaatggaggg acatgtaata acctggtgaa tggctacagg  | 2340 |
| tgtacatgca agaaggggtt caaaggctat aactgccagg tgaacataga tgagtgtgcc  | 2400 |
| tcgaaccctg gtctgaacca agggacctgc ctcgatgacg tcagtggcta cacctgccac  | 2460 |
| tgcattgctgc cttacacagg caagaattgt caaacgggtg tggcgccttg ctcccctaac | 2520 |

ES 2 532 405 T3

ccgtgtgaga acgctgcagt ttgtaaagag gcacccaact ttgagagcct cacctgcctg 2580  
 tgtgccctg gctggcaagg tcagcgtgt acagttgacg ttgatgagtg tgtctccaag 2640  
 ccgtgtatga acaatggcat ctgccataat actcaggga gctacatgtg cgagtgccct 2700  
 cccggcttca gtggtatgga ctgtgaggag gacatcaatg actgccttgc caaccctgc 2760  
 cagaacggag gctcctgtgt ggacaaagt aacaccttct cctgcctgtg ccttcctggc 2820  
 ttcgtagggg acaagtgcca aacagacatg aatgaatgtc tgagcgagcc ctgtaagaat 2880  
 ggggggacct gctctgacta cgtcaacagc tacacctgca cgtgccctgc gggcttccat 2940  
 ggagtccact gtgaaaacaa catcgatgag tgcaactgaga gctcctgttt caatggcggc 3000  
 acgtgtgttg atgggatcaa ctctttctct tgcttatgcc ctgtgggttt cactggtccc 3060  
 ttctgcctcc atgatataca tgagtgcagc tctaaccctg gcctgaattc gggaacgtgt 3120  
 gttgatggcc tgggtacctt ccgatgcacc tgtcccttgg gctacactgg gaaaaactgt 3180  
 cagacctgg tgaacctctg cagccccctt ccatgtaaaa acaaaggaac ttgtgctcag 3240  
 gaaaaggcaa ggccacgctg cctgtgtccg cctggatggg atggcgcata ctgtgatgtg 3300  
 ctcaatgtgt cctgtaaggc ggcagccttg cagaagggag tacctgttga acacttgtgc 3360  
 cagcactcgg gtatctgtat caatgctggc aacacgcata actgccagtg cccctgggc 3420  
 tacacgggga gctactgcga ggaacagctt gacgagtgtg cgtccaatcc atgccagcat 3480  
 ggtgccacct gcagtgactt catcggagga tacagatgtg agtgtgttcc agggatcag 3540  
 ggtgtcaact gtgagtatga agtggacgag tgccagaacc agccctgtca gaacggaggc 3600  
 acctgcatcg acctcgtgaa ccatttcaag tgctcgtgcc caccaggcac ccggggcctg 3660  
 ctttgtgaag agaacattga tgactgtgct ggggcccccc actgccttaa tgggtggccag 3720  
 tgtgtggacc ggattggagg ctacagttgt cgctgtttgc ctggctttgc tggggagcgg 3780  
 tgtgaggggg acatcaatga atgcctgtcc aatccttga gctcagaggg cagcctggac 3840  
 tgcattcagc tcaaaaataa ctaccagtgt gtctgccgca gcgccttcac aggccgacac 3900  
 tgcgaaacct tcctagatgt gtgtccccag aagccttgcc tgaatggagg gacttgtgct 3960  
 gtggctagca acgtgcctga tggcttcatt tgtcgttgtc cccaggggtt ctccggggca 4020  
 agatgccaga gcagctgtgg acaagtgaag tgcagaagag gggagcagtg tgtgcacacc 4080  
 gcctcgggac cccactgctt ctgcccgaac cacaaggact gcgagtcagg ttgcgctagt 4140  
 aaccctgcc agcacggagg cacctgtac cctcagcgc agcctcctta ctactcttgc 4200  
 cgctgctccc caccgttctg gggcagccac tgcgagagct acacagcccc caccagc 4257

<210> 8  
 <211> 4137  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 8

10 atggggctgg gggcccgggg ccgccgccgc cgtcgtcgc tgatggcctt gccaccgcca 60

ES 2 532 405 T3

ccaccgcca tgcggcgct gccctgctg ctgctgctag cggggctggg ggctgcagca 120  
 ccccttgctc tggatggaag cccatgtgca aatggaggtc ggtgcacca ccagcagccc 180  
 tccttgagg ctgcttgctc gtgctgcca ggctgggtgg gtgagcggtg ccagctgga 240  
 gaccctgccc actcaggccc ttgtgctggc cgaggcgttt gccagagttc agtgggtggc 300  
 ggcaccgccc gattctcctg tcgttgctc cgtggcttcc aaggcccaga ctgctcccag 360  
 ccagaccctc gcgtcagcag gccctgtggt catggtgccc cctgctcagt ggggccgat 420  
 ggccgatttg cctgtgcctg cccacctggc taccagggtc aaagctgcca aagtgcata 480  
 gatgagtgcc gatctggtac aacttgccgt catggtggta cctgtctcaa tacacctgga 540  
 tccttccgct gccagtgtcc tcttggttat acagggtgc tgtgtgagaa ccccgtagt 600  
 ccctgtgccc cttccccgtg tcgtaatggt ggcacctgta ggcagagcag tgatgtcaca 660  
 tatgactgtg cttgccttcc tggcttcgag ggcagaact gtgaagtcaa cgtggatgac 720  
 tgtcctggac atcgggtgct caatggggga acgtgtgtag acgggtgcaa tacttacaac 780  
 tgccagtgcc ctccggagtg gacaggccag ttctgtacag aagatgtgga tgagtgtcag 840  
 ctgcagccca atgcctgcca caatgggggt acctgcttca acctactggg tggccacagc 900  
 tgtgtatgtg tcaatggctg gacgggtgag agctgcagtc agaatatcga tgactgtgct 960  
 acagccgtgt gtttccatgg ggcacctgc catgacctg tggcctctt ctactgtgcc 1020  
 tgccctatgg ggaagacagg cctcttgtgt catctggatg atgcatgtgt cagcaacccc 1080  
 tgccatgagg atgctatctg tgacacaaac cctgtgagt gcccggccat ctgcacctgc 1140  
 ccacctggct tcaactggagg ggcatgtgac caggatgtgg atgagtgtc gattgggtgcc 1200  
 aaccctgtg aacatttggg tcggtgtgtg aatacacagg gctcattctt gtgccaatgt 1260  
 ggccgtggct atactggacc tcgctgtgag actgatgtca atgagtgtct ctccgggccc 1320  
 tgccgaacc aggccacgtg tcttgaccga attggccagt ttacttgcac ctgcatggca 1380  
 ggcttcacag ggacctactg tgagggtggac atcgacgaat gtcagagcag cccatgtgtc 1440  
 aatgggtggg tctgcaagga cagagtcaat ggcttcagct gcacctgccc atcaggattc 1500  
 agtgggtcca tgtgtcagct ggatgtggat gagtgtgcaa gcactccctg ccggaatggt 1560  
 gccaagtgtg tggaccagcc tgacggctat gagtgtcgct gtgcagaggg cttgagggc 1620  
 actttgtgtg agcgaacgt ggatgactgc tctccggatc cctgccacca cggcgctgt 1680  
 gtcgatggca ttgctagctt ctggtgtgct tgtgccccag gctatacggg catacgtgt 1740  
 gagagccagg tggatgagtg ccgcagccag cctgtcgat atgggggcaa atgtctagac 1800  
 ttggtggaca agtacctctg ccggtgtcct cccggaacca cagggtgtaa ctgtgaagtc 1860  
 aacattgatg actgtgccag taaccctgt acctttggag tttgccgtga tggcatcaac 1920  
 cgttatgact gtgtctgtca gcctggattc acagggcccc tctgcaacgt ggagatcaat 1980  
 gagtgtgcat ccagcccatg tggagagggg ggctcctgtg tggatgggga aaatggcttc 2040  
 cactgcctct gtccacctgg ctccctgcct ccactttgcc tacctgcgaa ccatccctgt 2100

ES 2 532 405 T3

gccacaagc cctgtagtca tggagtctgc catgatgcac caggcgggtt ccgctgtgtt 2160  
 tgtgagccc ggtggagtgg ccctcgtgt agccagagcc tggctccaga tgcctgtgag 2220  
 tcccagccct gccaggctgg tggcacctgc accagtgatg gaataggctt tcgctgcacc 2280  
 tgtgcccctg gattccaggg ccatcagtgt gaggtgctgt ccccctgtac tccaagcctc 2340  
 tgtgagcac gaggccactg tgagtctgac cctgaccggc tgactgtctg ttcctgtccc 2400  
 ccaggctggc aaggcccacg atgccagcag gatgtggatg aatgtgccgg tgcctcacc 2460  
 tgcggcccc atggtacctg caccaacctg ccagggaatt tcagggtgcat ctgccacagg 2520  
 ggatacactg gcccttctg tgatcaagac attgacgact gtgaccccaa cccgtgcctc 2580  
 catggtggct cctgccagga tggcgtgggc tcttttctt gttcttgctt cgacggcttt 2640  
 gctggtcctc gctgtgccc agatgtggac gaatgtctga gcagcccctg tggccctggc 2700  
 acctgtactg atcacgtggc ctcttcacc tgtgcctgtc cacctggtta tggaggcttc 2760  
 cactgtgaga ttgacttgcc ggactgcagc ccagttcct gcttcaatgg agggacctgt 2820  
 gtggatggcg tgagctcctt cagctgtctg tgtcgcccc gctacacagg cacacactgc 2880  
 caatacagag ctgaccctg cttttcccgg ccctgtctgc acgggggcat ctgcaacccc 2940  
 acccaccag gatttgaatg cacctgccgg gagggcttca ctgggagtca gtgtcagaac 3000  
 ccagtggact ggtgcagcca ggcaccctgt cagaatgggg gtcgctgtgt ccagactggg 3060  
 gcttactgca tttgtccacc tggatggagt ggccgctgt gcgacataca aagcctgccc 3120  
 tgcacggagg ccgagccca gatgggggtg aggttgagc agctgtgtca ggaagggtga 3180  
 aagtgcatag acaagggccg ctcccactac tgtgtgtgtc cagagggccg tacgggtagt 3240  
 cactgtgaac acgaggtgga tccctgcacg gccagcctt gccagcacgg gggcacttgc 3300  
 cgtggttaca tggggggcta tgtgtgtgag tgtccagctg gctatgctgg tgacagttgt 3360  
 gaggataata tagatgagtg tgcttccag ccctgccaga acggaggctc ctgtatcgat 3420  
 cttgtggccc gctatctctg ttcctgtccc cctggcacac tgggagttct ctgtgagatc 3480  
 aatgaggacg actgtgacct aggccatcc ttggactcag gcgttcagt cctacacaat 3540  
 ggcacctgtg tggacctggt ggggtggctt cgctgtaact gtccccagg atacacaggt 3600  
 ctgcaactgt aggcagacat caatgagtgt cgcccgggtg cctgccatgc agcgcatact 3660  
 cgggactgcc tacaagatcc aggtgggcat ttccgctgcg tctgccatcc tggcttcaca 3720  
 gggcctcgt gtcagattgc tctgtcccc tgtgagtccc agccatgtca gcatggaggc 3780  
 cagtgccgtc acagcctagg ccgtggaggt gggctgacct tcacctgtca ctgtgtcccg 3840  
 ccattctggg gtctgcgttg tgagcgggtg gcacgctctt gccgagagct gcagtgccca 3900  
 gtgggtatcc catgccagca gacagcccgt ggaccacgct gcgcttgtcc tccggggctg 3960  
 tccgggccct cctgccgggt ttctagggcg tcaccctcag gagctactaa cgccagctgc 4020  
 gcctctgccc cttgtctgca tgggggctca tgccctacctg tacagagtgt ccctttcttc 4080  
 cgctgtgtgt gcgctccggg ctggggcggc ccgcgttgtg agacccttc cgcagcc 4137

5 <210> 9  
 <211> 3510  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

10 <400> 9

ES 2 532 405 T3

|  |      |
|--|------|
| atgcagcccc agttgctgct gctgctgctc ttgccactca atttccctgt catcctgacc  | 60   |
| agagagcttc tgtgtggagg atccccagag ccctgtgcca acggaggcac ctgcctgagg  | 120  |
| ctatctcagg gacaagggat ctgccagtgt gccctggat ttctgggtga gacttgccag   | 180  |
| tttctgacc cctgcagggg taccctaactc tgcaagaatg gtggcagctg ccaagccctg  | 240  |
| ctccccacac ccccaagctc ccgtagtctt acttctccac tgaccctca cttctcctgc   | 300  |
| acctgccctt ctggcttcac cggtgatcga tgccaaacct atctggaaga gctctgtcca  | 360  |
| ccttctttct gttccaacgg gggtcactgc tatgttcagg cctcaggccg cccacagtgc  | 420  |
| tcctgcgagc ctgggtggac aggtgagcaa tgccagctcc gagacttctg ctcagccaac  | 480  |
| ccctgtgcca acggaggcgt gtgcctggcc acatacccc agatccagtg ccgctgtcca   | 540  |
| cctgggttcg agggtcacac ctgtgaacgc gacatcaacg agtgcttctt ggagccggga  | 600  |
| ccctgccctc agggcacctc ctgccataac acctggggtt cctaccagtg tctctgccct  | 660  |
| gtggggcagg aaggtcccca gtgcaagctc aggaaggagg cctgccctcc tggaagctgt  | 720  |
| ctcaatgggg gcacctgcca gctggtccca gagggacact ccaccttca tctctgcctc   | 780  |
| tgtccccag gtttcacggg gctggactgt gagatgaacc cagatgactg tgtcaggcac   | 840  |
| cagtgtcaga acggggccac ctgtctggat gggctggata cctacacctg cctctgcccc  | 900  |
| aagacatgga agggctggga ctgctctgaa gatatagatg aatgtgaagc ccggggctcc  | 960  |
| cctcgtgca ggaacggtgg cacctgccag aacacagctg gcagcttca ctgtgtgtgc    | 1020 |
| gtgagtggct ggggcggtgc aggttgtgag gagaacctgg atgactgtgc agctgccacc  | 1080 |
| tgtgccccgg gatccacctg catcgaccgt gtgggctctt tctcctgcct ctgcccacct  | 1140 |
| ggacgcacag gcctcctgtg ccacctggaa gacatgtgtt tgagtcagcc gtgccacgtg  | 1200 |
| aatgcccagt gcagcaccaa ccctctgaca ggctccacc tctgcatatg ccagcctggc   | 1260 |
| tactcaggat ccacctgtca ccaagatctg gatgagtgcc aaatggccca gcaaggacct  | 1320 |
| agtccctgcg aacatggcgg ctctctgac aacaccctg gctccttcaa ctgcctctgc    | 1380 |
| ctgcctgggtt acacgggctc ccgctgtgaa gctgaccaca atgagtgcct gtcacagccc | 1440 |
| tgccaccag gcagcacctg cctggacctg cttgcaacct tccactgcct ctgcccacca   | 1500 |
| ggcttgaag ggaggctctg tgagggtggag gtcaatgagt gcacctctaa tccctgcctg  | 1560 |
| aaccaagctg cctgcatga cctgctcaac ggcttccagt gcctctgcct tcctggattc   | 1620 |
| accggcgccc gatgtgagaa agacatggac gagtgtagca gcacccctg tgccaatggg   | 1680 |
| gggcgctgcc gagaccagcc tggagccttc tactgagagt gtctcccagg ctttgaaggg  | 1740 |

ES 2 532 405 T3

ccacactgtg agaaagaagt ggacgaatgt ctgagtgacc cctgccccgt gggagccagc 1800  
 tgccttgatc tccccggagc attcttctgc ctctgccgtc ctggtttcac aggtcaactt 1860  
 tgtgagggtc ccttgtgac cccaacatg tgccaacctg gacagcaatg ccaaggctcag 1920  
 gaacacagag cccctgcct ctgccctgac ggaagtccctg gctgtgttcc tgccgaggac 1980  
 aactgccctt gtcacatgg ccattgccag agatccttgt gtgtgtgtga tgagggctgg 2040  
 actggaccag aatgcgagac agaactgggt ggctgcatct ccacaccctg tgcccatggg 2100  
 gggacctgcc acccacagcc gtctggctac aactgtacct gccctgcagg ctacatgggg 2160  
 ttgacctgta gtgaggaggt gacagcttgt cactcagggc cctgtctcaa tgggtggctct 2220  
 tgcagcatcc gtcctgaggg ctattcctgc acctgccttc caagtcacac aggtcgccac 2280  
 tgccagactg ccgtggacca ctgtgtgtct gcctcgtgcc tcaatggggg tacctgtgtg 2340  
 aacaagcctg gcactttctt ctgcctctgt gccactggct tccaggggct gcactgtgag 2400  
 gagaagacta accccagctg tgcagacagc ccctgcagga acaaggcaac ctgccaagac 2460  
 acacctcgag gggcccgtg cctctgcagc cctggctata caggaagcag ctgccagact 2520  
 ctgatagact tgtgtgcccc gaagccctgt ccacacactg ctcgatgcct ccagagtggg 2580  
 ccctcgttcc agtgctgtg cctccagggg tggacagggg ctctctgtga cttcccactg 2640  
 tcctgccaga tggccgcaat gagccaaggc atagagatct ctggcctgtg ccagaatgga 2700  
 ggcctctgta ttgacacggg ctccctctat ttctgccgt gccctcctgg attccaaggc 2760  
 aagttatgcc aggataatat gaaccctgc gagcccaatc cctgccatca cgggtctacc 2820  
 tgtgtgcctc agcccagtg ctatgtctgc cagtgtgcc caggctatga gggacagaac 2880  
 tgctcaaaag tacttgaagc ttgtcagtc cagccctgcc acaaccacgg aacctgtacc 2940  
 tccaggcctg gaggcttcca ctgtgcctgc cctccaggct tcgtgggact gcgctgtgag 3000  
 ggagatgtgg atgagtgtct ggaccggccc tgtcacccct cgggcaactgc agcttgccac 3060  
 tctttagcca acgccttcta ctgccagtg ctgcctgggc acacaggcca gcggtgtgag 3120  
 gtggagatgg acctctgtca gagccaacct tgctccaatg gaggatcctg tgagatcaca 3180  
 acagggccac cccctggctt cacctgtcac tgccccaagg gttttgaagg cccacactgc 3240  
 agccacaaag cccttctctg cggcatccat cactgccaca atggaggcct atgtctgccc 3300  
 tcccctaagc cagggtcacc accactctgt gcctgcctca gtggttttgg gggccctgac 3360  
 tgtctgacac ctccagctcc accgggctgc ggtccccct caccctgcct gcacaatggt 3420  
 acctgactg agaccctgg gttgggcaac ccgggcttcc aatgcacctg ccctcctgac 3480  
 tctccagggc cccggtgtca aaggccaggg 3510

<210> 10  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

5

<400> 10

10 gatctgggcc cgggc 15

<210> 11  
 <211> 4299  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 11

ES 2 532 405 T3

|             |             |             |             |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| atgccgccgc  | tcctggcgcc  | cctgtctctgc | ctggcgctgc  | tgcccgcgct | cgccgcacga  | 60   |
| ggccccgat   | gctcccagcc  | cggtgagacc  | tgccatgaatg | gcgggaagtg | tgaagcggcc  | 120  |
| aatggcacgg  | aggcctcgct  | ctgtggcggg  | gccttcgtgg  | gcccgcgatg | ccaggacccc  | 180  |
| aaccctgcc   | tcagaccccc  | ctgcaagaac  | gccgggacat  | gccacgtggt | ggaccgcaga  | 240  |
| ggcgtggcag  | actatgcctg  | cagctgtgcc  | ctgggcttct  | ctgggcccct | ctgcctgaca  | 300  |
| cccctggaca  | atgcctgcct  | caccaacccc  | tgccgcaacg  | ggggcacctg | cgacctgctc  | 360  |
| acgctgacgg  | agtacaagtg  | ccgctgcccc  | cccggctggt  | cagggaaatc | gtgccagcag  | 420  |
| gctgaccgtg  | gcgctccaa   | cccctgcgcc  | aacggtggcc  | agtgcctgcc | cttcgaggcc  | 480  |
| tcctacatct  | gccaactgccc | accagcttc   | catggcccca  | cctgccggca | ggatgtcaac  | 540  |
| gagtgtggcc  | agaagcccgg  | gctttgccgc  | cacggaggca  | cctgccacaa | cgaggtcggc  | 600  |
| tcctaccgct  | gcgtctgccg  | cgccaccac   | actggcccca  | actgcgagcg | gccctacgtg  | 660  |
| ccctgcagcc  | cctgcacctg  | ccagaacggg  | ggcacctgcc  | gccccacggg | cgacgtcacc  | 720  |
| cacgagtgtg  | cctgcctgcc  | aggcttcacc  | ggccagaact  | gtgaggaaaa | tatcgacgat  | 780  |
| tgtccaggaa  | acaactgcaa  | gaacgggggt  | gcctgtgtgg  | acggcgtgaa | cacctacaac  | 840  |
| tgccgctgcc  | cgccagagtg  | gacaggtcag  | tactgtaccg  | aggatgtgga | cgagtgccag  | 900  |
| ctgatgcaa   | atgcctgcca  | gaacggcggg  | acctgccaca  | acaccacgg  | tggtacaac   | 960  |
| tgcgtgtgtg  | tcaacggctg  | gactgggtgag | gactgcagcg  | agaacattga | tgactgtgcc  | 1020 |
| agcggccct   | gcttccacgg  | cgccacctgc  | catgaccgtg  | tggcctcctt | ctactgcgag  | 1080 |
| tgtccccatg  | gccgcacagg  | tctgctgtgc  | cacctcaacg  | acgcatgcat | cagcaacccc  | 1140 |
| tgtaacgagg  | gctccaactg  | cgacaccaac  | cctgtcaatg  | gcaaggccat | ctgcacctgc  | 1200 |
| ccctcgggg   | acacgggccc  | ggcctgcagc  | caggacgtgg  | atgagtgctc | gctgggtgcc  | 1260 |
| aaccctcgg   | agcatgcggg  | caagtgcac   | aacacgctgg  | gctccttcga | gtgccagtgt  | 1320 |
| ctgcagggct  | acacgggccc  | ccgatgcgag  | atcgacgtca  | acgagtgcgt | ctcgaacccg  | 1380 |
| tgccagaacg  | acgccacctg  | cctggaccag  | attggggagt  | tccagtgcat | ctgcatgccc  | 1440 |
| ggctacgagg  | gtgtgcaactg | cgagggtcaac | acagacgagt  | gtgccagcag | cccctgcctg  | 1500 |
| cacaatggcc  | gctgcctgga  | caagatcaat  | gagttccagt  | gcgagtgccc | cacgggcttc  | 1560 |
| actgggcatc  | tgtgccagta  | cgatgtggac  | gagtgtgcca  | gcaccccctg | caagaatggt  | 1620 |
| gccaagtgcc  | tggaaggacc  | caacacttac  | acctgtgtgt  | gcacggaagg | gtacacgggg  | 1680 |
| acgcaactgcg | aggtggacat  | cgatgagtgc  | gaccccgacc  | cctgccacta | cggtcctctgc | 1740 |

ES 2 532 405 T3

aaggacggcg tcgccacctt cacctgcctc tgccgcccag gctacacggg ccaccactgc 1800  
gagaccaaca tcaacgagtg ctccagccag ccctgccgcc acgggggcac ctgccaggac 1860  
cgcgacaacg cctacctctg cttctgcctg aaggggacca caggaccaa ctgcgagatc 1920  
aacctggatg actgtgccag cagcccctgc gactcgggca cctgtctgga caagatcgat 1980  
ggctacgagt gtgcctgtga gccgggctac acaggggagca tgtgtaacat caacatcgat 2040  
gagtgtgcgg gcaaccctg ccacaacggg ggcacctgcg aggacggcat caatggcttc 2100  
acctgccgct gccccgaggg ctaccacgac cccacctgcc tgtctgaggt caatgagtg 2160  
aacagcaacc cctgcgtcca cggggcctgc cgggacagcc tcaacgggta caagtgcgac 2220  
tgtgaccctg ggtggagtgg gaccaactgt gacatcaaca acaatgagtg tgaatccaac 2280  
ccttgtgtca acggcggcac ctgcaaagac atgaccagtg gctacgtgtg cacctgccgg 2340  
gagggcttca gcggtcccaa ctgccagacc aacatcaacg agtgtgcgtc caaccatgt 2400  
ctgaaccagg gcacgtgtat tgacgacgtt gccgggtaca agtgcaactg cctgctgcc 2460  
tacacaggtg ccacgtgtga ggtggtgctg gccccgtgtg cccccagccc ctgcagaaac 2520  
ggcggggagt gcaggcaatc cgaggactat gagagcttct cctgtgtctg cccacgggc 2580  
tggcaagcag ggcagacctg tgaggctgac atcaacgagt gcgttctgag cccgtgccgg 2640  
cacggcgcac cctgccagaa caccacggc ggctaccgct gccactgcca ggccggctac 2700  
agtgggcgca actgcgagac cgacatcgac gactgccggc ccaaccctg tcacaacggg 2760  
ggctcctgca cagacggcat caacacggc ttctgcgact gcctgcccgg cttccggggc 2820  
actttctgtg aggaggacat caacgagtgt gccagtgacc cctgccgcaa cggggccaac 2880  
tgcacggact gcgtggacag ctacacgtgc acctgccccg caggcttcag cgggatccac 2940  
tgtgagaaca acacgcctga ctgcacagag agctcctgct tcaacgggtg cacctgcgtg 3000  
gacggcatca actcgttcac ctgcctgtgt ccaccggct tcacgggag ctactgccag 3060  
cacgatgtca atgagtgcga ctacagccc tgctgcatg gcggcacctg tcaggacggc 3120  
tgcggctcct acaggtgcac ctgccccag ggctacactg gcccactg ccagaacctt 3180  
gtgactggt gtgactcctc gccctgcaag aacggcggca aatgctggca gaccacacc 3240  
cagtaccgct gcgagtgcc cagcggctgg accggcctt actgcgacgt gccagcgtg 3300  
tcctgtgagg tggctgcgca gcgacaaggt gttgacgtt cccgcctgtg ccagcatgga 3360  
gggctctgtg tggacgcgg caacacgcac cactgccgct gccaggcggg ctacacaggc 3420  
agctactgtg aggacctggt ggacgagtgc tcaccagcc cctgccagaa cggggccacc 3480  
tgcacggact acctgggcgg ctactcctgc aagtgcgtgg ccggctacca cggggtgaac 3540  
tgctctgagg agatcgacga gtgcctctcc caccctgcc agaacggggg cacctgcctc 3600  
gacctccca acacctaaa gtgctcctgc ccacggggca ctcaggtgt gactgtgag 3660  
atcaacgtg acgactgcaa tccccctgt gacccctgt cccggagccc caagtcttt 3720  
aacaacggca cctgcgtgga ccaggtgggc ggctacagct gcacctgcc gccgggcttc 3780

ES 2 532 405 T3

gtgggtgagc gctgtgaggg ggatgtcaac gaggcctgt ccaatccctg cgacgcccg 3840  
 ggcacccaga actgctgca gcgctcaat gacttccact gcgagtgccg tgctggtcac 3900  
 accggcgcc gctgagagtc cgtcatcaat ggctgcaaag gcaagccctg caagaatggg 3960  
 ggcacctgag ccgtggcctc caacaccgcc cgcgggttca tctgcaagtg ccctgagggc 4020  
 ttcgagggcg ccacgtgtga gaatgacgct cgtacctgag gcagcctgag ctgcctcaac 4080  
 ggcggcacat gcatctccgg cccgcgcagc cccacctgcc tgtgcctggg ccccttcacg 4140  
 ggccccgaat gccagttccc ggccagcagc ccctgctggg gcggcaacct ctgctacaac 4200  
 caggggacct gtgagccac atccgagagc cccttctacc gttgcctgtg ccccgccaaa 4260  
 ttcaacgggc tcttgtgcca catcctggac tacagcttc 4299

<210> 12  
 <211> 4213  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 12

tcatctggaa ttatgcccgc cctgcgccc gctctgctgt gggcgctgct ggcgctctgg 60  
 ctgtgctgag cggccccgc gcatgcattg cagtgtcag atggctatga accctgtgta 120  
 aatgaaggaa tgtgtgttac ctaccacaat ggcacaggat actgcaaatg tccagaaggc 180  
 ttcttggggg aatattgtca acatcgagac ccctgtgaga agaaccgctg ccagaatggt 240  
 gggacttgtg tggcccaggc catgctgggg aaagccacgt gccgatgtgc ctcagggttt 300  
 acaggagagg actgccagta ctcaacatct catccatgct ttgtgtctcg accctgcctg 360  
 aatggcggca catgccatat gctcagccgg gatacctatg agtgcacctg tcaagtgcgg 420  
 tttacaggta aggagtcca atggacggat gcctgcctgt tcatccctg tgcaaatgga 480  
 agtacctgta cactgtggc caaccagttc tctgcaaat gcctcacagg cttcacaggg 540  
 cagaaatgtg agactgatgt caatgagtgt gacattccag gacactgcca gcatggtggc 600  
 acctgcctca acctgcctgg ttcctaccag tgccagtgcc ctcagggctt cacaggccag 660  
 tactgtgaca gcctgtatgt gccctgtgca ccctcacctt gtgtcaatgg aggcacctgt 720  
 cggcagactg gtgacttcac ttttgagtgc aactgccttc caggttttga agggagcacc 780  
 tgtgagagga atattgatga ctgccctaac cacagggtgc agaatggagg ggtttgtgtg 840  
 gatggggtca acacttaaa ctgccgctgt cccccacaat ggacaggaca gttctgcaca 900  
 gaggatgtgg atgaatgctt gctgcagccc aatgcctgtc aaaatggggg cacctgtgcc 960  
 aaccgcaatg gaggctatgg ctgtgtatgt gtcaacggct ggagtggaga tgactgcagt 1020  
 gagaacattg atgattgtgc cttgcctcc tgtactccag gctccacctg catcgaccgt 1080  
 gtggcctcct tctcttgcag gtgccagag ggggaaggcag gtctcctgtg tcatctggat 1140  
 gatgcatgca tcagcaatcc ttgccacaag ggggactgtg gtgacaccaa cccctaaat 1200  
 gggcaatata tttgcacctg cccacaaggc tacaagggg ctgactgcac agaagatgtg 1260

10

ES 2 532 405 T3

gatgaatgtg ccatggccaa tagcaatcct tgtgagcatg caggaaaatg tgtgaacacg 1320  
gatggcgctt tccactgtga gtgtctgaag ggttatgcag gacctcgttg tgagatggac 1380  
atcaatgagt gccattcaga cccctgccag aatgatgcta cctgtctgga taagattgga 1440  
ggcttcacat gtctgtgcat gccaggtttc aaaggtgtgc attgtgaatt agaaataaat 1500  
gaatgtcaga gcaacccttg tgtgaacaat gggcagtggtg tggataaagt caatcgtttc 1560  
cagtgccctgt gtcctcctgg tttcactggg ccagtttgcc agattgatat tgatgactgt 1620  
tccagtactc cgtgtctgaa tggggcaaag tgtatcgatc acccgaatgg ctatgaatgc 1680  
cagtggtcca caggtttcac tgggtgtgtg tgtgaggaga acattgacaa ctgtgacccc 1740  
gatccttgcc accatggtca gtgtcaggat ggtattgatt cctacacctg catctgcaat 1800  
cccgggtaca tgggcgccat ctgcagtgc cagattgatg aatggtacag cagcccttgc 1860  
ctgaacgatg gtcgctgcat tgacctggtc aatggctacc agtgcaactg ccagccaggc 1920  
acgtcagggg ttaattgtga aattaatttt gatgactgtg caagtaacct ttgtatccat 1980  
ggaatctgta tggatggcat taatcgctac agttgtgtct gctcaccagg attcacaggg 2040  
cagagatgta acattgacat tgatgagtggt gcctccaatc cctgtcgsaa gggtgcaaca 2100  
tgtatcaacg gtgtgaatgg tttccgctgt atatgccccg agggacccca tcaccccagc 2160  
tgctactcac aggtgaacga atgcctgagc aatccctgca tccatggaaa ctgtactgga 2220  
ggctcagtg gatataagtg tctctgtgat gcaggctggg ttggcatcaa ctgtgaagtg 2280  
gacaaaaatg aatgcctttc gaatccatgc cagaatggag gaacttgtga caatctggtg 2340  
aatggataca ggtgtacttg caagaagggc tttaaaggct ataactgcca ggtgaatatt 2400  
gatgaatgtg cctcaaatcc atgcctgaac caaggaacct gctttgatga cataagtggc 2460  
tacacttgcc actgtgtgct gccatacaca ggcaagaatt gtcagacagt attggctccc 2520  
tgttcccaa acccttgtga gaatgctgct gtttgcaaag agtcaccaa ttttgagagt 2580  
tatacttgct tgtgtgctcc tggctggcaa ggtcagcggg gtaccattga cattgacgag 2640  
tgtatctcca agccctgcat gaaccatggt ctctgccata acaccaggg cagctacatg 2700  
tgtgaatgtc caccaggctt cagtggtatg gactgtgagg aggacattga tgactgcctt 2760  
gccaatcctt gccagaatgg aggttcctgt atggatggag tgaatacttt ctctgcctc 2820  
tgcttccgg gtttacttg ggataagtgc cagacagaca tgaatgagtg tctgagtgaa 2880  
ccctgtaaga atggaggac ctgctctgac tacgtcaaca gttacacttg caagtgccag 2940  
gcaggatttg atggagtcca ttgtgagaac aacatcaatg agtgactga gagctcctgt 3000  
ttcaatggtg gcacatgtgt tgatgggatt aactccttct cttgcttgtg ccctgtgggt 3060  
ttcactggat ccttctgcct ccatgagatc aatgaatgca gctctcatcc atgcctgaat 3120  
gagggaacgt gtgttgatgg cctgggtacc taccgctgca gctgccccct gggctacact 3180  
gggaaaaact gtcagaccct ggtgaatctc tgcagtcggt ctccatgtaa aaacaaaggt 3240

ES 2 532 405 T3

acttgtgttc agaaaaaagc agagtcccag tgcctatgtc catctggatg ggctgggtgcc 3300  
tattgtgacg tgcccaatgt ctcttgtgac atagcagcct ccaggagagg tgtgcttgtt 3360  
gaacacttgt gcccagcactc aggtgtctgc atcaatgctg gcaacacgca ttactgtcag 3420  
tgccccctgg gctatactgg gagctactgt gaggagcaac tcgatgagtg tgcgtccaac 3480  
ccctgccagc acggggcaac atgcagtgac ttcattgggtg gatacagatg cgagtgtgtc 3540  
ccaggctatc aggggtgcaa ctgtgagtat gaagtggatg agtgccagaa tcagccctgc 3600  
cagaatggag gcacctgtat tgacctgtg aaccatttca agtgctcttg cccaccaggc 3660  
actcggggcc tactctgtga agagaacatt gatgactgtg cccgggggcc ccattgcctt 3720  
aatggtggtc agtgcattga taggattgga ggctacagtt gtcgctgctt gcctggcttt 3780  
gctggggagc gttgtgaggg agacatcaac gagtgctct ccaaccctg cagctctgag 3840  
ggcagcctgg actgtataca gctcaccaat gactacctgt gtgtttgccg tagtgccctt 3900  
actggccggc actgtgaaac ctctgcgat gtgtgtcccc agatgccctg cctgaatgga 3960  
gggacttgtg ctgtggccag taacatgcct gatggtttca tttgccgtt tccccggga 4020  
ttttccgggg caagtgcca gagcagctgt ggacaagtga aatgtaggaa gggggagcag 4080  
tgtgtgcaca ccgcctctgg accccgctgc ttctgcccc gtcgccggga ctgagagtca 4140  
ggctgtgcca gtagcccctg ccagcacggg ggcagctgcc accctcagcg ccagcctcct 4200  
tattactcct gcc 4213

<210> 13  
<211> 3974  
5 <212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 13

atggggccgg gggcccgtgg ccgccccgc cgccgtcgcc cgatgtcgcc gccaccgcca 60  
ccgccaccgg tgcgggcgct gcccctgctg ctgctgctag cggggccggg ggctgcagcc 120  
cccccttgcc tggacggaag cccgtgtgca aatggaggtc gttgcacca gctgccctcc 180  
cgggaggctg cctgcctgtg cccgcctggc tgggtgggtg agcgggtgca gctggaggac 240  
ccctgtcact caggcccctg tgctggccgt ggtgtctgcc agagttcagt ggtggctggc 300  
accgcccgat tctatgccg gtgccccgt ggcttccgag gccctgactg ctccctgcca 360  
gatccctgcc tcagcagccc ttgtgcccac ggtgcccgt gctcagtggg gcccgatgga 420  
cgcttctct gctctgccc acctggctac cagggccgca gctgccgaag cgacgtggat 480  
gagtgccggg tgggtgagcc ctgccccat ggtggcacct gcctcaacac acctggctcc 540  
ttccgctgcc agtgtccagc tggctacaca gggccactat gtgagaacct cgcggtgccc 600  
tgtgcaccct caccatgccg taacgggggc acctgcaggc agagtggcga cctcacttac 660  
gactgtgcct gtcttcttgg gtttgggggt cagaattgtg aagtgaacgt ggacgactgt 720  
10 ccaggacacc gatgtctcaa tggggggaca tgcgtggatg gcgtcaacac ctataactgc 780

ES 2 532 405 T3

cagtgcctc ctgagtggac aggccagttc tgcacggagg<sup>-</sup> acgtggatga gtgtcagctg 840  
 cagcccaacg cctgccacaa tgggggtacc tgcttcaaca cgctgggtgg ccacagctgc 900  
 gtgtgtgtca atggctggac aggcgagagc tgcagtcaga atatcgatga ctgtgccaca 960  
 gccgtgtgct tccatggggc cacctgccat gaccgcgtgg cttctttcta ctgtgcctgc 1020  
 cccatgggca agactggcct cctgtgtcac ctggatgacg cctgtgtcag caaccctgc 1080  
 cacgaggatg ctatctgtga cacaaatccg gtgaacggcc gggccatttg cacctgtcct 1140  
 cccggcttca cgggtggggc atgtgaccag gatgtggacg agtgctctat cggcgccaac 1200  
 ccctgcgagc acttgggagc gtgcgtgaac acgcagggct ccttcctgtg ccagtgcggt 1260  
 cgtggctaca ctggacctg ctgtgagacc gatgtcaacg agtgtctgtc ggggccctgc 1320  
 cgaaccagc ccactgcct cgaccgata ggcagttca cctgtatctg tatggcaggc 1380  
 ttcacaggaa cctattgcga ggtggacatt gacgagtgtc agagtagccc ctgtgtcaac 1440  
 ggtgggtct gcaaggaccg agtcaatggc ttcagctgca cctgccccctc gggcttcagc 1500  
 ggctccacgt gtcagctgga cgtggacgaa tgcgccagca cgccctgcag gaatggcgcc 1560  
 aatgcgtgg accagcccga tggctacgag tgccgctgtg ccgagggctt tgagggcacg 1620  
 ctgtgtgatc gcaacgtgga cgactgtcc cctgaccat gccaccatgg tcgctgcgtg 1680  
 gatggcatcg ccagcttctc atgtgcctgt gtcctggct acacgggcac acgctgcgag 1740  
 agccaggtgg acgaatgccg cagccagccc tgccgccatg gcggcaaatg cctagacctg 1800  
 gtggacaagt acctctgccg ctgcccttct gggaccacag gtgtgaactg cgaagtgaac 1860  
 attgacgact gtgccagcaa cccctgcacc tttggagtct gccgtgatgg catcaaccgc 1920  
 tacgactgtg tctgccaacc tggcttcaca gggccccctt gtaacgtgga gatcaatgag 1980  
 tgtgcttcca gcccatgcgg cgagggaggt tcctgtgtgg atggggaaaa tggcttccgc 2040  
 tgcctctgcc cgcttgctc cttgccccca ctctgcctcc ccccgagcca tcctgtgcc 2100  
 catgagccct gtagtcaagg catctgctat gatgcacctg gcgggttccg ctgtgtgtgt 2160  
 gagcctggct ggagtggccc ccgctgcagc cagagcctgg cccgagacgc ctgtgagtcc 2220  
 cagccgtgca gggccggtgg gacatgcagc agcgatggaa tgggtttcca ctgcacctgc 2280  
 ccgcctgggtg tccagggagc tcagtgtgaa ctctctccc cctgcacccc gaaccctgt 2340  
 gagcatgggg gccgctgcga gtctgccctt ggcagctgc ctgtctgctc ctgccccag 2400  
 ggctggcaag gccacgatg ccagcaggat gtggacgagt gtgctggccc cgcaccctgt 2460  
 ggccctcatg gtatctgcac caacctggca gggagtcca gctgcacctg ccatggaggg 2520  
 tacactggcc cttctgcga tcaggacatc aatgactgtg accccaacc atgcctgaac 2580  
 ggtggctcgt gccaagacgg cgtgggtcc tttctctgct cctgcctccc tggtttcgcc 2640  
 ggcccacgat gcgcccgcga tgtggatgag tgccctgagca acccctgcgg cccgggcacc 2700  
 tgtaccgacc acgtggcctc cttcacctgc acctgcccgc caggctacgg aggctccac 2760  
 tgcgaacagg acctgcccga ctgcagcccc agctcctgct tcaatggcgg gacctgtgtg 2820

ES 2 532 405 T3

gacggcgtga actcgttcag ctgcctgtgc cgtcccggct acacaggagc ccaactgccaa 2880  
 catgaggcag acccctgcct ctcgcggccc tgcctacacg ggggcgtctg cagcgcgcgc 2940  
 caccctggct tccgctgcac ctgcctcgag agcttcacgg gcccgcagtg ccagacgctg 3000  
 gtggattggt gcagccgcca gccttgtaaa aacgggggtc gctgcgtcca gactggggcc 3060  
 tattgccttt gtcctcctgg atggagcggg cgcctctgtg acatccgaag cttgccctgc 3120  
 agggaggccg cagcccagat cgggggtcgg ctggagcagc tgtgtcaggc ggggtggcag 3180  
 tgtgtggatg aagacagctc ccaactactgc gtgtgcccag agggccgtac tggtagccac 3240  
 tgtgagcagg aggtggacct ctgcttgacc cagccctgcc agcatggggg gacctgccgt 3300  
 ggctatatgg ggggtacat gtgtgagtgt ttccttggt acaatggtga taactgtgag 3360  
 gacgacgtgg acgagtgtgc ctcccagccc tgcagcacg ggggttcatt cattgacctc 3420  
 gtggcccgtc atctctgctc ctgtccccc ggaacgctgg ggggtgctctg cgagattaat 3480  
 gaggatgact gcggcccagg cccaccgctg gactcagggc cccgggtcct acacaatggc 3540  
 acctgcgtgg acctggtggg tggtttccgc tgcacctgct ccccaggata cactggtttg 3600  
 cgctgcgagg cagacatcaa tgagtgtcgc tcagggtcct gccacgcggc acacaccggt 3660  
 gactgcctgc aggaccagc cggaggtttc cgttgccctt gtcattgctg cttctcaggt 3720  
 cctcgtgtgc agactgtcct gtctccctgc gagtcccagc catgccagca tggaggccag 3780  
 tgccgtccta gccgggtcc tgggggtggg ctgaccttca cctgtcactg tgcccagccg 3840  
 ttctggggtc cgcgttgca gcgggtggcg cgctcctgcc gggagctgca gtgcccgggtg 3900  
 ggcgtccat gccagcagac gccccgcggg ccgcgctgcg cctgcccccc agggttgtcg 3960  
 ggaccctcct gccg 3974

<210> 14  
 <211> 3522  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 14

atgcagcccc cttcactgct gctgctgctg ctgctgctgc tgcctgctatg tgtctcagtg 60  
 gtcagaccca gagggctgct gtgtgggagt ttcccagaac cctgtgcca tggaggcacc 120  
 tgcctgagcc tgtctctggg acaagggacc tgcagctgtg cccctggctt cctgggtgag 180  
 acgtgccagt ttctgacct ctgccagaac gccagctct gccaatagg aggcagctgc 240  
 caagccctgc ttccgctcc cctagggctc cccagctctc cctctccatt gacaccagc 300  
 ttctgtgca cttgcctccc tggcttcaact ggtgagagat gccaggcca gcttgaagac 360  
 cctgtcctc cctccttctg ttccaaaagg gggcgtgccc acatccaggc ctcgggcccgc 420  
 ccacagtgtc cctgcatgcc tggatggaca ggtgagcagt gccagcttcg ggacttctgt 480  
 tcagccaacc catgtgtaa tggaggggtg tgtctggcca cataccccca gatccagctgc 540  
 cactgcccac cgggcttcga gggccatgcc tgtgaacgtg atgtcaacga gtgcttccag 600

10

ES 2 532 405 T3

gaccaggac cctgcccacaa aggcacctcc tgccataaca ccctgggctc cttccagtgc 660  
ctctgccctg tggggcagga ggggtccacgt tgtgagctgc gggcaggacc ctgccctcct 720  
aggggctgtt cgaatggggg cacctgccag ctgatgccag agaaagactc cacctttcac 780  
ctctgcctct gtcccccagg tttcataggc ccagactgtg aggtgaatcc agacaactgt 840  
gtcagccacc agtgtcagaa tgggggactc tgccaggatg ggctggacac ctacacctgc 900  
ctctgccag aaacctggac aggtcgggac tgctccgaag atgtggatga gtgtgagacc 960  
cagggctccc ctactgcag aaacgggggc acctgccaga actctgctgg tagctttcac 1020  
tgcgtgtgtg tgagtggctg gggcggcaca agctgtgagg agaacctgga tgactgtatt 1080  
gctgccacct gtgccccggg atccacctgc attgaccggg tgggctcttt ctctgcctc 1140  
tgccacctg gacgcacagg actcctgtgc cacttggaag acatgtgtct gagccagccg 1200  
tgccatgggg atgccaatg cagcaccaac cccctcacag gctccacact ctgcctgtgt 1260  
cagcctggct attcggggcc cacctgccac caggacctgg acgagtgtct gatggcccag 1320  
caaggcccaa gtccctgtga acatggcggg tcctgcctca aactcctgg ctcttcaac 1380  
tgcctctgtc cacctggcta cacaggctcc cgttgtgagg ctgatcaca tgagtgcctc 1440  
tcccagccct gccaccagg aagcacctgt ctggacctac ttgccacctt ccaactgcctc 1500  
tgcccgccag gcttagaagg gcagctctgt gaggtggaga ccaacgagtg tgctcagct 1560  
ccctgcctga accacgcgga ttgccatgac ctgctcaacg gcttccagtg catctgcctg 1620  
cctggattct ccggcaccg atgtgaggag gatatcgatg agtgcagaag ctctccctgt 1680  
gccaatggtg ggcagtgcc aagaccagct ggagccttc actgcaagtg tctcccaggc 1740  
tttgaagggc cacgctgtca aacagagggt gatgagtgcc tgagtgacct atgtcccgtt 1800  
ggagccagct gccttgatct tccaggagcc ttcttttgc tctgcccctc tggtttca 1860  
ggccagctct gtgaggttcc cctgtgtgtc cccaacctgt gccagccaa gcagatatgt 1920  
aaggaccaga aagacaagg caactgcctc tgcctgatg gaagccctgg ctgtgcccc 1980  
cctgaggaca actgcacct ccaccacggg cactgccaga gatcctcatg tgtgtgtgac 2040  
gtgggttga cggggccaga gtgtgaggca gagctagggg gctgcatctc tgcaccctgt 2100  
gccccatggg ggacctgcta cccccagccc tctggctaca actgcacctg ccctacaggc 2160  
tacacaggac ccacctgtag tgaggagatg acagcttgtc actcagggcc atgtctcaat 2220  
ggcggctcct gcaaccctag ccctggaggc tactactgca cctgcccctc aagccacaca 2280  
gggccccagt gccaaaccag cactgactac tgtgtgtctg ccccgctt caatgggggt 2340  
acctgtgtga acaggcctgg caccttctcc tgctctgtg ccatgggctt ccagggccg 2400  
cgctgtgagg gaaagctccg cccagctgt gcagacagcc cctgtaggaa tagggcaacc 2460  
tgccaggaca gccctcaggg tccccgctgc ctctgcccac ctggctacac cggaggcagc 2520  
tgccagactc tgatggactt atgtgcccag aagccctgcc cacgcaattc ccaactgcctc 2580

ES 2 532 405 T3

cagactgggc cctccttcca ctgcttggtc ctccagggat ggaccgggcc tctctgcaac 2640  
 cttccactgt cctcctgcca gaaggctgca ctgagccaag gcatagacgt ctcttcctt 2700  
 tgccacaatg gaggcctctg tgtcgacagc ggcccctctt atttctgcca ctgccccct 2760  
 ggattccaag gcagcctgtg ccaggatcac gtgaacccat gtgagtccag gccttgccag 2820  
 aacggggcca cctgcatggc ccagcccagt gggtatctct gccagtgtgc cccaggctac 2880  
 gatggacaga actgctcaaa ggaactcgat gcttgtcagt cccaaccctg tcacaacat 2940  
 ggaacctgta ctcccaaacc tggaggattc cactgtgcct gccctccagg ctttgtgggg 3000  
 ctacgctgtg agggagacgt ggacgagtgt ctggaccagc cctgccacc cacaggcact 3060  
 gcagcctgcc actctctggc caatgccttc tactgccagt gtctgcctgg acacacaggc 3120  
 cagtgggtgtg aggtggagat agaccctgc cacagccaac cctgctttca tggagggacc 3180  
 tgtgaggcca cagcaggatc acccctgggt tcatctgccc actgccccaa gggttttgaa 3240  
 ggccccacct gcagccacag ggcccccttc tgcggcttc atcactgcca ccacggaggc 3300  
 ctgtgtctgc cctcccctaa gccaggcttc ccaccacgt gtgcctgcct cagtggctat 3360  
 gggggctctg actgcctgac cccaccagct cctaaaggct gtggccctcc ctccccatgc 3420  
 ctatacaatg gcagctgctc agagaccacg ggcttggggg gcccaggctt tcgatgctcc 3480  
 tgcctcaca gctctccagg gccccggtgt cagaaaccg ga 3522

<210> 15  
 <211> 6966  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

atggggccgg gggcccgtgg ccgccgcgc cgcgctgcc cgatgtgcc gccaccgcca 60  
 ccgccaccg tgcgggcgt gccctgctg ctgctgctag cggggccggg ggctgcagcc 120  
 cccccttgcc tggacggaag cccgtgtgca aatggaggtc gttgcacca gctgccctcc 180  
 cgggaggctg cctgcctgtg cccgcctggc tgggtgggtg agcgggtgca gctggaggac 240  
 ccctgtcact caggcccctg tgctggccgt ggtgtctgcc agagttcagt ggtggctggc 300  
 accgccgat tctcatgcc gtgccccctg ggcttccag gccctgactg ctccctgcca 360  
 gatccctgcc tcagcagccc ttgtgccac ggtgccctg gctcagtggg gcccgatgga 420  
 cgcttctct gctcctgccc acctggctac cagggccgca gctgccgaag cgacgtggat 480  
 gagtgccggg tgggtgagcc ctgccccat ggtggcacct gcctcaacac acctggctcc 540  
 ttccgctgcc agtgtccagc tggctacaca gggcactat gtgagaacct cgcggtgccc 600  
 tgtgcgccct caccatgcc taacgggggc acctgcaggc agagtggcga cctcacttac 660  
 gactgtgcct gtcttcttg gtttgagggt cagaattgtg aagtgaacgt ggacgactgt 720  
 ccaggacacc gatgtctcaa tggggggaca tgcgtggatg gcgtcaacac ctataactgc 780  
 cagtgccctc ctgagtggac aggccagttc tgcacggagg acgtggatga gtgtcagctg 840

10

ES 2 532 405 T3

cagcccaacg cctgccacaa tgggggtaac tgcttcaaca cgctgggtgg ccacagctgc 900  
 gtgtgtgtca atggctggac aggcgagagc tgcagtcaga atatcgatga ctgtgccaca 960  
 gccgtgtgct tccatggggc cacctgccat gaccgcgtgg cttctttcta ctgtgcctgc 1020  
 cccatgggca agactggcct cctgtgtcac ctggatgacg cctgtgtcag caaccctgc 1080  
 cacgaggatg ctatctgtga cacaaatccg gtgaacggcc gggccatttg cacctgtcct 1140  
 cccggcttca cgggtggggc atgtgaccag gatgtggacg agtgctctat cggcgccaac 1200  
 ccctgcgagc acttgggagc gtgcgtgaac acgcagggct cttcctgtg ccagtgcggt 1260  
 cgtggctaca ctggacctg ctgtgagacc gatgtcaacg agtgtctgtc ggggccctgc 1320  
 cgaaaccagg ccacgtgcct cgaccgata ggccagttca cctgtatctg tatggcaggc 1380  
 ttcacaggaa cctattgca ggtggacatt gacgagtgtc agagtagccc ctgtgtcaac 1440  
 ggtgggtct gcaaggaccg agtcaatggc ttcagctgca cctgcccctc gggcttcagc 1500  
 ggctccacgt gtcagctgga cgtggacgaa tgcgccagca cgccctgcag gaatggcgcc 1560  
 aatgcgtgg accagcccga tggctacgag tgccgctgtg ccgagggctt tgagggcacg 1620  
 ctgtgtgatc gcaacgtgga cgactgctcc cctgaccat gccaccatgg tcgctgcgtg 1680  
 gatggcatcg ccagcttctc atgtgcctgt gctcctggct acacgggcac acgctgcgag 1740  
 agccagggtg acgaatgccg cagccagccc tgccgccatg gcggcaaatg cctagacctg 1800  
 gtggacaagt acctctgccg ctgcccttct gggaccacag gtgtgaactg cgaagtgaac 1860  
 attgacgact gtgccagcaa cccctgcacc tttggagtct gccgtgatgg catcaaccgc 1920  
 tacgactgtg tctgccaacc tggcttcaca gggcccctt gtaacgtgga gatcaatgag 1980  
 tgtgttcca gcccatgcgg cgagggaggt tcctgtgtgg atggggaaa tggttccgc 2040  
 tgccctgccc cgctggctc cttgccccca ctctgcctcc ccccagacca tccctgtgcc 2100  
 catgaccct gcagtcacgg catctgctat gatgcacctg gcgggttccg ctgtgtgtgt 2160  
 gagcctggct ggagtggccc ccgctgcagc cagagcctgg cccgagacgc ctgtgagtcc 2220  
 cagccgtgca gggccggtgg gacatgcagc agcgatggaa tgggtttcca ctgcacctgc 2280  
 ccgcctgggt tccagggacg tcagtgtgaa ctctctccc cctgcacccc gaaccctgt 2340  
 gagcatgggg gccgctgcga gtctgcccct ggccagctgc ctgtctgtc ctgccccag 2400  
 ggctggcaag gcccacgat ccagcaggat gtggacgagt gtgctggccc cgcacctgt 2460  
 ggccctcatg gtatctgcac caacctggca gggagtcca gctgcacctg ccatggaggg 2520  
 tacactggcc ctctctgtga tcaggacatc aatgactgtg accccaacc atgcctgaac 2580  
 ggtggctcgt gccaaagacg cgtgggctcc ttttctgct cctgcctccc tggtttcgcc 2640  
 ggcccacgat gcgcccgcga tgtggatgag tgctgagca acccctgcgg cccgggcacc 2700  
 tgtaccgacc acgtggcctc cttcacctgc acctgcccgc caggctacgg aggcttcac 2760  
 tgcaaacagg acctgcccga ctgcagcccc agctcctgct tcaatggcgg gacctgtgtg 2820  
 gacggcgtga actcgttcag ctgcctgtgc cgtccccgct acacaggagc ccaactgcaa 2880

ES 2 532 405 T3

catgaggcag acccctgcct ctgcgcccc tgcctacacg ggggcgtctg cagcgcgcc 2940  
 caccctggct tccgctgcac ctgcctcgag agcttcacgg gcccgcagtg ccagacgctg 3000  
 gtggattggt gcagccgcca gccttgtcaa aacgggggtc gctgcgtcca gactggggcc 3060  
 tattgccttt gtccccctgg atggagcgga cgcctctgtg acatccgaag cttgccctgc 3120  
 agggaggccg cagccagat cgggggtgcg ctggagcagc tgtgtcaggc gggtagggcag 3180  
 tgtgtggatg aagacagctc cactactgc gtgtgcccag agggccgtac tggtagccac 3240  
 tgtgagcagg aggtggacc ctgcttgcc cagccctgcc agcatggggg gacctgccgt 3300  
 ggctatatgg ggggctacat gtgtgagtgt cttctggct acaatggtga taactgtgag 3360  
 gacgacgtgg acgagtgtgc ctcccagccc tgccagcacg ggggttcattg cattgacctc 3420  
 gtggcccgt atctctgctc ctgtccccc ggaacgctgg ggggtgctctg cgagattaat 3480  
 gaggatgact gcggcccagg cccaccgctg gactcagggc cccggtgcct acacaatggc 3540  
 acctgcgtgg acctggtggg tggtttccgc tgcacctgct cccaggata cactggtttg 3600  
 cgctgcgagg cagacatcaa tgagtgtcgc tcaggtgcct gccacgcggc acacaccgg 3660  
 gactgcctgc aggaccagc cggaggtttc cgttgccctt gtcagtctgg cttctcaggt 3720  
 cctcgtgtc agactgtcct gtctccctgc gagtcccagc catgccagca tggaggccag 3780  
 tgccgtccta gcccgggtcc tgggggtggg ctgacctca cctgtcactg tgcccagccg 3840  
 ttctggggtc cgcgtgcca gcgggtggcg cgctcctgcc gggagctgca gtgcccgggtg 3900  
 ggcgccccat gccagcagac gcccgcggg ccgcgctgcg cctgcccccc agggttgtcg 3960  
 ggaccctct gcccgagctt cccggggtcg ccgcccgggg ccagcaacgc cagctgcgcg 4020  
 gccgccccct gtctccacgg gggctcctgc cgccccgcgc cgctcgcgcc cttcttccgc 4080  
 tgcgcttgcg cgcagggctg gaccgggccg cgctgcgagg cgcccgccgc ggcaccggag 4140  
 gtctcgagg agccgcggtg cccgcgcgcc gcctgccagg ccaagcgcgg ggaccagcgc 4200  
 tgcgaccgcg agtgcaacag cccaggctgc ggtgggacg gcggcgactg ctcgctgagc 4260  
 gtgggcgacc cctggcgga atgcgaggcg ctgcagtgt ggcgcctctt caacaacagc 4320  
 cgctgcgacc ccgcctgcag ctgcgccgcc tgcctctacg acaacttcga ctgccacgcc 4380  
 ggtggcccg agcgcacttg caaccgggtg tacgagaagt actgcgccga ccactttgcc 4440  
 gacggccgt gcgaccaggg ctgcaacacg gaggagtgcg gctgggatgg gctggattgt 4500  
 gccagcgagg tgccggccct gctggcccgc ggcgtgctgg tgctcacagt gctgctgccg 4560  
 ccagaggagc tactgcgttc cagcgcggac tttctgcagc ggctcagcgc catcctgcgc 4620  
 acctcgtgc gcttccgctt ggacgcgcac ggccaggcca tggctttccc ttaccaccgg 4680  
 cctagtcctg gctccgaacc ccgggcccgt cgggagctgg cccccgaggt gatcggctcg 4740  
 gtagtaatgc tggagattga caaccggctc tgcctgcagt cgcctgagaa tgatcactgc 4800  
 ttccccgatg cccagagcgc cgctgactac ctgggagcgt tgctcagcgg ggagcgcctg 4860

ES 2 532 405 T3

gacttcccgt acccactgcg ggacgtgcgg ggggagccgc tggagcctcc agaaccagc 4920  
gtcccgtgc tgccactgct agtggcgggc gctgtcttgc tgctggtcat tctcgtcctg 4980  
ggtgtcatgg tggcccggcg caagcgcgag cacagcacc tctggttccc tgagggcttc 5040  
tactgcaca aggacgtggc ctctggtcac aagggccggc ggaaccctg gggccaggac 5100  
gcgctgggca tgaagaacat ggccaagggt gagagcctga tgggggaggt ggccacagac 5160  
tggatggaca cagagtgcc agaggccaag cgctaaagg tagaggagcc aggcattggg 5220  
gctgaggagg ctgtggattg ccgtcagtgg actcaacacc atctggttgc tgctgacatc 5280  
cgcgtggcac cagccatggc actgacacca ccacagggcg acgcagatgc tgatggcatg 5340  
gatgtcaatg tgcgtggccc agatggcttc accccgctaa tgctggcttc cttctgtggg 5400  
ggggctctgg agccaatgcc aactgaagag gatgaggcag atgacacatc agctagcatc 5460  
atctccgacc tgatctgcca gggggctcag ctggggcac ggactgaccg tactggcgag 5520  
actgctttgc acctggctgc ccgttatgcc cgtgctgatg cagccaagcg gctgctggat 5580  
gctggggcag acaccaatgc ccaggaccac tcaggccgca ctcccctgca cacagctgtc 5640  
acagccgatg cccagggtgt cttccagatt ctcacccgaa accgctctac agacttggat 5700  
gcccgatgg cagatggctc aacggcactg atcctggcgg cccgcctggc agtagagggc 5760  
atggtggaag agctcatcgc cagccatgct gatgtcaatg ctgtggatga gcttgggaaa 5820  
tcagccttac actgggctgc ggctgtgaac aacgtggaag ccactttggc cctgctcaaa 5880  
aatggagcca ataaggacat gcaggatagc aaggaggaga cccccctatt cctggccgcc 5940  
cgcgagggca gctatgaggc tgccaagctg ctgttgacc actttgcaa ccgtgagatc 6000  
accgaccacc tggacaggct gccgcgggac gtagcccagg agagactgca ccaggacatc 6060  
gtgcgcttgc tggatcaacc cagtgggccc cgcagcccc ccggtcccca cggcctgggg 6120  
cctctgctct gtcctccagg ggccctcctc cctggcctca aagcggcaca gtcggggtcc 6180  
aagaagagca ggaggcccc cggaaggcg gggctggggc cgcaggggccc ccgggggccc 6240  
ggcaagaagc tgacgtggc ctgcccgggc cccctggctg acagctcggc cacgctgtcg 6300  
cccgtggact cgctggactc cccgcggcct ttcggtgggc cccctgcttc ccctggtggc 6360  
ttccccctg aggggccccta tgcaagctgc actgccactg cagtgtctct ggcacagctt 6420  
ggtggcccag gccgggccc tctagggcgc cagccccctg gaggatgtgt actcagcctg 6480  
ggcctgctga accctgtggc tgtgcccctc gattgggccc ggctgcccc acctgcccc 6540  
ccagggcccct cgttcctgct gccactggcg ccgggacccc agctgctcaa cccagggacc 6600  
cccgtctccc cgcaggagcg gccccgcct tacctggcag tcccaggaca tggcgaggag 6660  
taccggcgcg ctggggcaca cagcagcccc ccaaaggccc gcttcctgcg ggttcccagt 6720  
gagcacctt acctgacccc atccccgaa tcccctgagc actgggcccag ccctcacct 6780  
ccctccctct cagactggtc cgaatccacg cctagcccag ccaactgccac tggggccatg 6840  
gccaccacca ctggggcact gcctgcccag ccacttcctt tgtctgttcc cagctccctt 6900  
gctcaggccc agaccagct ggggccccag ccggaagtta ccccaagag gcaagtgtt 6960  
gcctga 6966

5 <210> 16  
<211> 2321  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 16

ES 2 532 405 T3

Met Gly Pro Gly Ala Arg Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Met Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Arg Ala Leu Pro Leu Leu Leu Leu  
 20 25 30  
 Leu Ala Gly Pro Gly Ala Ala Ala Pro Pro Cys Leu Asp Gly Ser Pro  
 35 40 45  
 Cys Ala Asn Gly Gly Arg Cys Thr Gln Leu Pro Ser Arg Glu Ala Ala  
 50 55 60  
 Cys Leu Cys Pro Pro Gly Trp Val Gly Glu Arg Cys Gln Leu Glu Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Cys His Ser Gly Pro Cys Ala Gly Arg Gly Val Cys Gln Ser Ser  
 85 90 95  
 Val Val Ala Gly Thr Ala Arg Phe Ser Cys Arg Cys Pro Arg Gly Phe  
 100 105 110  
 Arg Gly Pro Asp Cys Ser Leu Pro Asp Pro Cys Leu Ser Ser Pro Cys  
 115 120 125  
 Ala His Gly Ala Arg Cys Ser Val Gly Pro Asp Gly Arg Phe Leu Cys  
 130 135 140  
 Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Gln Gly Arg Ser Cys Arg Ser Asp Val Asp  
 145 150 155 160  
 Glu Cys Arg Val Gly Glu Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Leu Asn  
 165 170 175  
 Thr Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Gly Pro  
 180 185 190  
 Leu Cys Glu Asn Pro Ala Val Pro Cys Ala Pro Ser Pro Cys Arg Asn  
 195 200 205  
 Gly Gly Thr Cys Arg Gln Ser Gly Asp Leu Thr Tyr Asp Cys Ala Cys  
 210 215 220

ES 2 532 405 T3

Leu Pro Gly Phe Glu Gly Gln Asn Cys Glu Val Asn Val Asp Asp Cys  
 225 230 235 240  
 Pro Gly His Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Val Asn  
 245 250 255  
 Thr Tyr Asn Cys Gln Cys Pro Pro Glu Trp Thr Gly Gln Phe Cys Thr  
 260 265 270  
 Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Gln Pro Asn Ala Cys His Asn Gly  
 275 280 285  
 Gly Thr Cys Phe Asn Thr Leu Gly Gly His Ser Cys Val Cys Val Asn  
 290 295 300  
 Gly Trp Thr Gly Glu Ser Cys Ser Gln Asn Ile Asp Asp Cys Ala Thr  
 305 310 315 320  
 Ala Val Cys Phe His Gly Ala Thr Cys His Asp Arg Val Ala Ser Phe  
 325 330 335  
 Tyr Cys Ala Cys Pro Met Gly Lys Thr Gly Leu Leu Cys His Leu Asp  
 340 345 350  
 Asp Ala Cys Val Ser Asn Pro Cys His Glu Asp Ala Ile Cys Asp Thr  
 355 360 365  
 Asn Pro Val Asn Gly Arg Ala Ile Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Thr  
 370 375 380  
 Gly Gly Ala Cys Asp Gln Asp Val Asp Glu Cys Ser Ile Gly Ala Asn  
 385 390 395 400  
 Pro Cys Glu His Leu Gly Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Ser Phe Leu  
 405 410 415  
 Cys Gln Cys Gly Arg Gly Tyr Thr Gly Pro Arg Cys Glu Thr Asp Val  
 420 425 430  
 Asn Glu Cys Leu Ser Gly Pro Cys Arg Asn Gln Ala Thr Cys Leu Asp  
 435 440 445  
 Arg Ile Gly Gln Phe Thr Cys Ile Cys Met Ala Gly Phe Thr Gly Thr  
 450 455 460  
 Tyr Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Gln Ser Ser Pro Cys Val Asn  
 465 470 475 480  
 Gly Gly Val Cys Lys Asp Arg Val Asn Gly Phe Ser Cys Thr Cys Pro

ES 2 532 405 T3

| 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Phe | Ser | Gly | Ser | Thr | Cys | Gln | Leu | Asp | Val | Asp | Glu | Cys | Ala |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Ser | Thr | Pro | Cys | Arg | Asn | Gly | Ala | Lys | Cys | Val | Asp | Gln | Pro | Asp | Gly |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Tyr | Glu | Cys | Arg | Cys | Ala | Glu | Gly | Phe | Glu | Gly | Thr | Leu | Cys | Asp | Arg |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Asn | Val | Asp | Asp | Cys | Ser | Pro | Asp | Pro | Cys | His | His | Gly | Arg | Cys | Val |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Asp | Gly | Ile | Ala | Ser | Phe | Ser | Cys | Ala | Cys | Ala | Pro | Gly | Tyr | Thr | Gly |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Thr | Arg | Cys | Glu | Ser | Gln | Val | Asp | Glu | Cys | Arg | Ser | Gln | Pro | Cys | Arg |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| His | Gly | Gly | Lys | Cys | Leu | Asp | Leu | Val | Asp | Lys | Tyr | Leu | Cys | Arg | Cys |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Pro | Ser | Gly | Thr | Thr | Gly | Val | Asn | Cys | Glu | Val | Asn | Ile | Asp | Asp | Cys |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Asn | Pro | Cys | Thr | Phe | Gly | Val | Cys | Arg | Asp | Gly | Ile | Asn | Arg |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Tyr | Asp | Cys | Val | Cys | Gln | Pro | Gly | Phe | Thr | Gly | Pro | Leu | Cys | Asn | Val |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Glu | Ile | Asn | Glu | Cys | Ala | Ser | Ser | Pro | Cys | Gly | Glu | Gly | Gly | Ser | Cys |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Val | Asp | Gly | Glu | Asn | Gly | Phe | Arg | Cys | Leu | Cys | Pro | Pro | Gly | Ser | Leu |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Pro | Pro | Leu | Cys | Leu | Pro | Pro | Ser | His | Pro | Cys | Ala | His | Glu | Pro | Cys |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Ser | His | Gly | Ile | Cys | Tyr | Asp | Ala | Pro | Gly | Gly | Phe | Arg | Cys | Val | Cys |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Glu | Pro | Gly | Trp | Ser | Gly | Pro | Arg | Cys | Ser | Gln | Ser | Leu | Ala | Arg | Asp |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Ala | Cys | Glu | Ser | Gln | Pro | Cys | Arg | Ala | Gly | Gly | Thr | Cys | Ser | Ser | Asp |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |

ES 2 532 405 T3

Gly Met Gly Phe His Cys Thr Cys Pro Pro Gly Val Gln Gly Arg Gln  
755 760 765

Cys Glu Leu Leu Ser Pro Cys Thr Pro Asn Pro Cys Glu His Gly Gly  
770 775 780

Arg Cys Glu Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Val Cys Ser Cys Pro Gln  
785 790 795 800

Gly Trp Gln Gly Pro Arg Cys Gln Gln Asp Val Asp Glu Cys Ala Gly  
805 810 815

Pro Ala Pro Cys Gly Pro His Gly Ile Cys Thr Asn Leu Ala Gly Ser  
820 825 830

Phe Ser Cys Thr Cys His Gly Gly Tyr Thr Gly Pro Ser Cys Asp Gln  
835 840 845

Asp Ile Asn Asp Cys Asp Pro Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys  
850 855 860

Gln Asp Gly Val Gly Ser Phe Ser Cys Ser Cys Leu Pro Gly Phe Ala  
865 870 875 880

Gly Pro Arg Cys Ala Arg Asp Val Asp Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys  
885 890 895

Gly Pro Gly Thr Cys Thr Asp His Val Ala Ser Phe Thr Cys Thr Cys  
900 905 910

Pro Pro Gly Tyr Gly Gly Phe His Cys Glu Gln Asp Leu Pro Asp Cys  
915 920 925

Ser Pro Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Val Asn  
930 935 940

Ser Phe Ser Cys Leu Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Ala His Cys Gln  
945 950 955 960

His Glu Ala Asp Pro Cys Leu Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Val  
965 970 975

Cys Ser Ala Ala His Pro Gly Phe Arg Cys Thr Cys Leu Glu Ser Phe  
980 985 990

Thr Gly Pro Gln Cys Gln Thr Leu Val Asp Trp Cys Ser Arg Gln Pro  
995 1000 1005

Cys Gln Asn Gly Gly Arg Cys Val Gln Thr Gly Ala Tyr Cys Leu  
1010 1015 1020

ES 2 532 405 T3

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Arg Leu Cys Asp Ile Arg Ser Leu  
 1025 1030 1035  
 Pro Cys Arg Glu Ala Ala Ala Gln Ile Gly Val Arg Leu Glu Gln  
 1040 1045 1050  
 Leu Cys Gln Ala Gly Gly Gln Cys Val Asp Glu Asp Ser Ser His  
 1055 1060 1065  
 Tyr Cys Val Cys Pro Glu Gly Arg Thr Gly Ser His Cys Glu Gln  
 1070 1075 1080  
 Glu Val Asp Pro Cys Leu Ala Gln Pro Cys Gln His Gly Gly Thr  
 1085 1090 1095  
 Cys Arg Gly Tyr Met Gly Gly Tyr Met Cys Glu Cys Leu Pro Gly  
 1100 1105 1110  
 Tyr Asn Gly Asp Asn Cys Glu Asp Asp Val Asp Glu Cys Ala Ser  
 1115 1120 1125  
 Gln Pro Cys Gln His Gly Gly Ser Cys Ile Asp Leu Val Ala Arg  
 1130 1135 1140  
 Tyr Leu Cys Ser Cys Pro Pro Gly Thr Leu Gly Val Leu Cys Glu  
 1145 1150 1155  
 Ile Asn Glu Asp Asp Cys Gly Pro Gly Pro Pro Leu Asp Ser Gly  
 1160 1165 1170  
 Pro Arg Cys Leu His Asn Gly Thr Cys Val Asp Leu Val Gly Gly  
 1175 1180 1185  
 Phe Arg Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Leu Arg Cys Glu  
 1190 1195 1200  
 Ala Asp Ile Asn Glu Cys Arg Ser Gly Ala Cys His Ala Ala His  
 1205 1210 1215  
 Thr Arg Asp Cys Leu Gln Asp Pro Gly Gly Gly Phe Arg Cys Leu  
 1220 1225 1230  
 Cys His Ala Gly Phe Ser Gly Pro Arg Cys Gln Thr Val Leu Ser  
 1235 1240 1245  
 Pro Cys Glu Ser Gln Pro Cys Gln His Gly Gly Gln Cys Arg Pro  
 1250 1255 1260  
 Ser Pro Gly Pro Gly Gly Gly Leu Thr Phe Thr Cys His Cys Ala  
 1265 1270 1275

ES 2 532 405 T3

Gln Pro Phe Trp Gly Pro Arg Cys Glu Arg Val Ala Arg Ser Cys  
 1280 1285 1290

Arg Glu Leu Gln Cys Pro Val Gly Val Pro Cys Gln Gln Thr Pro  
 1295 1300 1305

Arg Gly Pro Arg Cys Ala Cys Pro Pro Gly Leu Ser Gly Pro Ser  
 1310 1315 1320

Cys Arg Ser Phe Pro Gly Ser Pro Pro Gly Ala Ser Asn Ala Ser  
 1325 1330 1335

Cys Ala Ala Ala Pro Cys Leu His Gly Gly Ser Cys Arg Pro Ala  
 1340 1345 1350

Pro Leu Ala Pro Phe Phe Arg Cys Ala Cys Ala Gln Gly Trp Thr  
 1355 1360 1365

Gly Pro Arg Cys Glu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Glu Val Ser Glu  
 1370 1375 1380

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Ala Lys Arg Gly Asp  
 1385 1390 1395

Gln Arg Cys Asp Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly Cys Gly Trp Asp  
 1400 1405 1410

Gly Gly Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly Asp Pro Trp Arg Gln Cys  
 1415 1420 1425

Glu Ala Leu Gln Cys Trp Arg Leu Phe Asn Asn Ser Arg Cys Asp  
 1430 1435 1440

Pro Ala Cys Ser Ser Pro Ala Cys Leu Tyr Asp Asn Phe Asp Cys  
 1445 1450 1455

His Ala Gly Gly Arg Glu Arg Thr Cys Asn Pro Val Tyr Glu Lys  
 1460 1465 1470

Tyr Cys Ala Asp His Phe Ala Asp Gly Arg Cys Asp Gln Gly Cys  
 1475 1480 1485

Asn Thr Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Ser Glu  
 1490 1495 1500

Val Pro Ala Leu Leu Ala Arg Gly Val Leu Val Leu Thr Val Leu  
 1505 1510 1515

Leu Pro Pro Glu Glu Leu Leu Arg Ser Ser Ala Asp Phe Leu Gln

ES 2 532 405 T3

|                         |                     |                     |                 |      |
|-------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|------|
| 1520                    |                     | 1525                |                 | 1530 |
| Arg Leu Ser Ala Ile Leu | Arg Thr Ser Leu Arg | Arg Thr Ser Leu Arg | Phe Arg Leu Asp |      |
| 1535                    |                     | 1540                | 1545            |      |
| Ala His Gly Gln Ala Met | Val Phe Pro Tyr His | Val Phe Pro Tyr His | Arg Pro Ser Pro |      |
| 1550                    |                     | 1555                | 1560            |      |
| Gly Ser Glu Pro Arg Ala | Arg Arg Glu Leu Ala | Arg Arg Glu Leu Ala | Pro Glu Val Ile |      |
| 1565                    |                     | 1570                | 1575            |      |
| Gly Ser Val Val Met Leu | Glu Ile Asp Asn Arg | Glu Ile Asp Asn Arg | Leu Cys Leu Gln |      |
| 1580                    |                     | 1585                | 1590            |      |
| Ser Pro Glu Asn Asp His | Cys Phe Pro Asp Ala | Cys Phe Pro Asp Ala | Gln Ser Ala Ala |      |
| 1595                    |                     | 1600                | 1605            |      |
| Asp Tyr Leu Gly Ala Leu | Ser Ala Val Glu Arg | Ser Ala Val Glu Arg | Leu Asp Phe Pro |      |
| 1610                    |                     | 1615                | 1620            |      |
| Tyr Pro Leu Arg Asp Val | Arg Gly Glu Pro Leu | Arg Gly Glu Pro Leu | Glu Pro Pro Glu |      |
| 1625                    |                     | 1630                | 1635            |      |
| Pro Ser Val Pro Leu Leu | Pro Leu Leu Val Ala | Pro Leu Leu Val Ala | Gly Ala Val Leu |      |
| 1640                    |                     | 1645                | 1650            |      |
| Leu Leu Val Ile Leu Val | Leu Gly Val Met Val | Leu Gly Val Met Val | Ala Arg Arg Lys |      |
| 1655                    |                     | 1660                | 1665            |      |
| Arg Glu His Ser Thr Leu | Trp Phe Pro Glu Gly | Trp Phe Pro Glu Gly | Phe Ser Leu His |      |
| 1670                    |                     | 1675                | 1680            |      |
| Lys Asp Val Ala Ser Gly | His Lys Gly Arg Arg | His Lys Gly Arg Arg | Glu Pro Val Gly |      |
| 1685                    |                     | 1690                | 1695            |      |
| Gln Asp Ala Leu Gly Met | Lys Asn Met Ala Lys | Lys Asn Met Ala Lys | Gly Glu Ser Leu |      |
| 1700                    |                     | 1705                | 1710            |      |
| Met Gly Glu Val Ala Thr | Asp Trp Met Asp Thr | Asp Trp Met Asp Thr | Glu Cys Pro Glu |      |
| 1715                    |                     | 1720                | 1725            |      |
| Ala Lys Arg Leu Lys Val | Glu Glu Pro Gly Met | Glu Glu Pro Gly Met | Gly Ala Glu Glu |      |
| 1730                    |                     | 1735                | 1740            |      |
| Ala Val Asp Cys Arg Gln | Trp Thr Gln His His | Trp Thr Gln His His | Leu Val Ala Ala |      |
| 1745                    |                     | 1750                | 1755            |      |
| Asp Ile Arg Val Ala Pro | Ala Met Ala Leu Thr | Ala Met Ala Leu Thr | Pro Pro Gln Gly |      |
| 1760                    |                     | 1765                | 1770            |      |

ES 2 532 405 T3

Asp Ala 1775 Asp Ala Asp Gly Met 1780 Asp Val Asn Val Arg 1785 Gly Pro Asp  
 Gly Phe 1790 Thr Pro Leu Met Leu 1795 Ala Ser Phe Cys Gly 1800 Gly Ala Leu  
 Glu Pro 1805 Met Pro Thr Glu Glu 1810 Asp Glu Ala Asp Asp 1815 Thr Ser Ala  
 Ser Ile 1820 Ile Ser Asp Leu Ile 1825 Cys Gln Gly Ala Gln 1830 Leu Gly Ala  
 Arg Thr 1835 Asp Arg Thr Gly Glu 1840 Thr Ala Leu His Leu 1845 Ala Ala Arg  
 Tyr Ala 1850 Arg Ala Asp Ala Ala 1855 Lys Arg Leu Leu Asp 1860 Ala Gly Ala  
 Asp Thr 1865 Asn Ala Gln Asp His 1870 Ser Gly Arg Thr Pro 1875 Leu His Thr  
 Ala Val 1880 Thr Ala Asp Ala Gln 1885 Gly Val Phe Gln Ile 1890 Leu Ile Arg  
 Asn Arg 1895 Ser Thr Asp Leu Asp 1900 Ala Arg Met Ala Asp 1905 Gly Ser Thr  
 Ala Leu 1910 Ile Leu Ala Ala Arg 1915 Leu Ala Val Glu Gly 1920 Met Val Glu  
 Glu Leu 1925 Ile Ala Ser His Ala 1930 Asp Val Asn Ala Val 1935 Asp Glu Leu  
 Gly Lys 1940 Ser Ala Leu His Trp 1945 Ala Ala Ala Val Asn 1950 Asn Val Glu  
 Ala Thr 1955 Leu Ala Leu Leu Lys 1960 Asn Gly Ala Asn Lys 1965 Asp Met Gln  
 Asp Ser 1970 Lys Glu Glu Thr Pro 1975 Leu Phe Leu Ala Ala 1980 Arg Glu Gly  
 Ser Tyr 1985 Glu Ala Ala Lys Leu 1990 Leu Leu Asp His Phe 1995 Ala Asn Arg  
 Glu Ile 2000 Thr Asp His Leu Asp 2005 Arg Leu Pro Arg Asp 2010 Val Ala Gln  
 Glu Arg 2015 Leu His Gln Asp Ile 2020 Val Arg Leu Leu Asp 2025 Gln Pro Ser

ES 2 532 405 T3

Gly Pro Arg Ser Pro Pro Gly Pro His Gly Leu Gly Pro Leu Leu  
 2030 2035 2040

Cys Pro Pro Gly Ala Phe Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Gln Ser  
 2045 2050 2055

Gly Ser Lys Lys Ser Arg Arg Pro Pro Gly Lys Ala Gly Leu Gly  
 2060 2065 2070

Pro Gln Gly Pro Arg Gly Arg Gly Lys Lys Leu Thr Leu Ala Cys  
 2075 2080 2085

Pro Gly Pro Leu Ala Asp Ser Ser Val Thr Leu Ser Pro Val Asp  
 2090 2095 2100

Ser Leu Asp Ser Pro Arg Pro Phe Gly Gly Pro Pro Ala Ser Pro  
 2105 2110 2115

Gly Gly Phe Pro Leu Glu Gly Pro Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr  
 2120 2125 2130

Ala Val Ser Leu Ala Gln Leu Gly Gly Pro Gly Arg Ala Gly Leu  
 2135 2140 2145

Gly Arg Gln Pro Pro Gly Gly Cys Val Leu Ser Leu Gly Leu Leu  
 2150 2155 2160

Asn Pro Val Ala Val Pro Leu Asp Trp Ala Arg Leu Pro Pro Pro  
 2165 2170 2175

Ala Pro Pro Gly Pro Ser Phe Leu Leu Pro Leu Ala Pro Gly Pro  
 2180 2185 2190

Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Pro Val Ser Pro Gln Glu Arg Pro  
 2195 2200 2205

Pro Pro Tyr Leu Ala Val Pro Gly His Gly Glu Glu Tyr Pro Ala  
 2210 2215 2220

Ala Gly Ala His Ser Ser Pro Pro Lys Ala Arg Phe Leu Arg Val  
 2225 2230 2235

Pro Ser Glu His Pro Tyr Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Glu  
 2240 2245 2250

His Trp Ala Ser Pro Ser Pro Pro Ser Leu Ser Asp Trp Ser Glu  
 2255 2260 2265

Ser Thr Pro Ser Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Met Ala Thr Thr  
 2270 2275 2280

Thr Gly Ala Leu Pro Ala Gln Pro Leu Pro Leu Ser Val Pro Ser  
 2285 2290 2295

Ser Leu Ala Gln Ala Gln Thr Gln Leu Gly Pro Gln Pro Glu Val  
 2300 2305 2310

Thr Pro Lys Arg Gln Val Leu Ala  
 2315

ES 2 532 405 T3

<211> 714  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 17

```

gatctgggccc cgggcgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgccca    60
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc    120
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac    180
cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag    240
ccgctgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac    300
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc    360
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc    420
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa    480
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac    540
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcttcta cagcaagctc    600
accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag    660
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga        714
    
```

10 <210> 18  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 18

```

Asp Leu Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
1           5           10
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
20          25          30
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
35          40          45
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
50          55          60
    
```

ES 2 532 405 T3

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 85 90 95  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 100 105 110  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 115 120 125  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 130 135 140  
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 145 150 155 160  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 165 170 175  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 180 185 190  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 195 200 205  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 210 215 220  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230 235

5 <210> 19  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19  
 10 gaggagccgc gg 12  
 <210> 20  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 20  
 20 ccgcggtcc tc 12  
 <210> 21  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 21  
 Glu Glu Pro Arg  
 1  
 30 <210> 22  
 <211> 17

<212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 22  
 5 gaggagccgc gagatct 17  
 <210> 23  
 <211> 17  
 10 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23  
 15 agatctcgcg gctcctc 17  
 <210> 24  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 24  
 gaggagccgc gagatctggg cccg 24  
 25 <210> 25  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 25  
 cgggccccaga tctcgggct cctc 24  
 35 <210> 26  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 26  
**Glu Glu Pro Arg Asp Leu Gly Pro**  
**1 5**  
 <210> 27  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 27  
 50 **Met Gly Pro Gly Ala Arg Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Met Ser**  
**1 5 10 15**  
**Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Arg Ala Leu Pro Leu Leu Leu Leu**  
**20 25 30**  
**Leu Ala Gly Pro Gly Ala Ala Ala**  
**35 40**  
 55 <210> 28  
 <211> 120  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 60 <400> 28

ES 2 532 405 T3

**atggggccgg gggcccgtgg ccgccgccgc cgccgtcgcc cgatgtcgcc gccaccgcca 60**  
**ccgccacccg tgcgggcgct gcccctgctg ctgctgctag cggggccggg ggctgcagcc 120**  
 5 <210> 29  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 29  
 10 **Met Trp Gly Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala**  
**1 5 10 15**  
**Thr Leu Cys Thr Ala Arg**  
**20**  
 15 <210> 30  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 30  
 20 **atgtggggct ggaagtgcct cctcttctgg gctgtgctgg tcacagccac tctctgcact 60**  
**gccagg 66**  
 25 <210> 31  
 <211> 4872  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 31  
**atggggccgg gggcccgtgg ccgccgccgc cgccgtcgcc cgatgtcgcc gccaccgcca 60**  
**ccgccacccg tgcgggcgct gcccctgctg ctgctgctag cggggccggg ggctgcagcc 120**  
**cccccttgcc tggacggaag cccgtgtgca aatggaggtc gttgcaccca gctgccctcc 180**  
**cgggaggctg cctgcctgtg cccgcctggc tgggtgggtg agcgggtgca gctggaggac 240**  
**ccctgtcact caggcccctg tgctggccgt ggtgtctgcc agagttcagt ggtggctggc 300**  
**accgcccgat tctcatgccg gtgccccgt ggcttccgag gccctgactg ctccctgcca 360**  
**gatccctgcc tcagcagccc ttgtgcccac ggtgcccgt gctcagtggg gcccgatgga 420**  
**cgcttctct gctcctgccc acctggctac cagggccgca gctgccgaag cgacgtggat 480**  
**gagtgccggg tgggtgagcc ctgccgccat ggtggcacct gcctcaacac acctggctcc 540**  
 30

ES 2 532 405 T3

ttccgctgcc agtgtccagc tggctacaca gggccactat<sup>-</sup>gtgagaaccc cgcggtgccc 600  
 tgtgcgccct caccatgccg taacgggggc acctgcaggc agagtggcga cctcacttac 660  
 gactgtgcct gtcttctctg gtttgagggg cagaattgtg aagtgaacgt ggacgactgt 720  
 ccaggacacc gatgtctcaa tggggggaca tgcgtggatg gcgtcaacac ctataactgc 780  
 cagtgccctc ctgagtggac aggccagttc tgcacggagg acgtggatga gtgtcagctg 840  
 cagcccaacg cctgccacaa tgggggtacc tgcttcaaca cgctgggtgg ccacagctgc 900  
 gtgtgtgtca atggctggac aggcgagagc tgcagtcaga atatc gatga ctgtgccaca 960  
 gccgtgtgct tccatggggc cacctgccat gaccgcgtgg cttcttttcta ctgtgcctgc 1020  
 cccatgggca agactggcct cctgtgtcac ctggatgacg cctgtgtcag caaccctgc 1080  
 cacgaggatg ctatctgtga cacaaatccg gtgaacggcc gggccatttg cacctgtcct 1140  
 cccggcttca cgggtggggc atgtgaccag gatgtggacg agtgctctat cggcgccaac 1200  
 ccctgcgagc acttgggagc gtgcgtgaac acgcagggct ccttcctgtg ccagtgcggt 1260  
 cgtggctaca ctggacctg ctgtgagacc gatgtcaacg agtgctctgtc ggggccctgc 1320  
 cgaaaccagg ccacgtgctc cgaccgcata ggccagttca cctgtatctg tatggcaggc 1380  
 ttcacaggaa cctattgcga ggtggacatt gacgagtgtc agagtagccc ctgtgtcaac 1440  
 ggtggggctc gcaaggaccg agtcaatggc ttcagctgca cctgcccctc gggcttcagc 1500  
 ggctccacgt gtcagctgga cgtggacgaa tgcgccagca cgccctgcag gaatggcgcc 1560  
 aatgcgtgg accagcccga tggctacgag tggcgtgtg ccgagggctt tgagggcacg 1620  
 ctgtgtgatc gcaacgtgga cgactgtccc cctgacccat gccaccatgg tcgctgcgtg 1680  
 gatggcatcg ccagttctc atgtgcctgt gctcctggct acacgggcac acgctgcgag 1740  
 agccaggtgg acgaatgccg cagccagccc tggcgccatg gcggcaaatg cctagacctg 1800  
 gtggacaagt acctctgccg ctgcccttct gggaccacag gtgtgaaactg cgaagtgaac 1860  
 attgacgact gtgccagcaa cccctgcacc tttggagtct gccgtgatgg catcaaccgc 1920  
 tacgactgtg tctgccaacc tggcttcaca gggcccctt gtaacgtgga gatcaatgag 1980  
 tgtgcttcca gcccatgcgg cgagggaggt tctgtgtggt atggggaaaa tggcttccgc 2040  
 tgcctctgcc cgcctggctc cttgccccca ctctgcctcc ccccgagcca tccctgtgcc 2100  
 catgagccct gcagtacag catctgctat gatgcacctg gcgggttccg ctgtgtgtgt 2160  
 gagcctggct ggagtggccc ccgctgcagc cagagcctgg cccgagacgc ctgtgagtcc 2220  
 cagccgtgca gggccggtgg gacatgcagc agcgatggaa tgggtttcca ctgcacctgc 2280  
 ccgcctgggtg tccagggacg tcagtgtgaa ctctctccc cctgcacccc gaaccctgt 2340  
 gagcatgggg gccgctgcga gtctgcccct ggccagctgc ctgtctgtct ctgccccag 2400  
 ggctggcaag gccacgatg ccagcaggat gtggacgagt gtgctggccc cgcaccctgt 2460  
 ggccctcatg gtatctgcac caacctggca gggagtttca gctgcacctg ccatggaggg 2520  
 tacactggcc cttcctgtga tcaggacatc aatgactgtg accccaaccc atgcctgaac 2580

ES 2 532 405 T3

ggtggctcgt gccaaagacgg cgtgggctcc ttttcctgct cctgcctccc tggtttcgcc 2640  
 ggccccacgat gcgccccgca tgtggatgag tgccctgagca acccctgcgg cccgggcacc 2700  
 tgtaccgacc acgtggcctc cttcacctgc acctgcccgc caggctacgg aggtttccac 2760  
 tgcgaacagg acctgcccga ctgcagcccc agctcctgct tcaatggcgg gacctgtgtg 2820  
 gacggcgtga actcgttcag ctgcctgtgc cgtcccggct acacaggagc ccaactgccaa 2880  
 catgaggcag acccctgcct ctgcgggccc tgccctacac ggggcgtctg cagcgcggcc 2940  
 caccctggct tccgctgcac ctgcctcgag agcttcacgg gcccgcagtg ccagacgctg 3000  
 gtggattggt gcagccgcca gccttgtcaa aacggggggtc gctgcgtcca gactggggcc 3060  
 tattgccttt gtccccctgg atggagcgga cgcctctgtg acatccgaag cttgcccctgc 3120  
 agggaggccg cagcccagat cgggggtcgg ctggagcagc tgtgtcaggc ggggtggcag 3180  
 tgtgtggatg aagacagctc ccaactactgc gtgtgcccag agggccgtac tggtagccac 3240  
 tgtgagcagg aggtggaccc ctgcttgccc cagccctgcc agcatggggg gacctgccgt 3300  
 ggctatatgg ggggctacat gtgtgagtgt cttcctggct acaatggtga taactgtgag 3360  
 gacgacgtgg acgagtgtgc ctcccagccc tgccagcacg ggggttcattg cattgacctc 3420  
 gtggcccgtc atctctgctc ctgtccccc ggaacgctgg ggggtgctctg cgagattaat 3480  
 gaggatgact gcggcccagg cccaccgctg gactcagggc cccgggtgcct acacaatggc 3540  
 acctgcgtgg acctgggtggg tggtttccgc tgcacctgtc cccaggata cactggtttg 3600  
 cgctgcgagg cagacatcaa tgagtgtcgc tcagggtgcct gccacgcggc acacaccgg 3660  
 gactgcctgc aggacccagg cggaggtttc cgttgccctt gtcatgctgg cttctcaggt 3720  
 cctcgtgtc agactgtcct gtctccctgc gactcccagc catgcccagca tggaggccag 3780  
 tgccgtccta gcccgggtcc tgggggtggg ctgaccttca cctgtcactg tgcccagccg 3840  
 ttctggggtc cgcgttgca gcgggtggcg cgctcctgcc gggagctgca gtgcccgggtg 3900  
 ggcgtcccat gccagcagac gcccgcggg ccgcgctgcg cctgcccccc agggttgtcg 3960  
 ggaccctcct gccgcagctt cccggggctc cgccggggg ccagcaacgc cagctgcgcg 4020  
 gccgccccct gtctccacgg gggctcctgc cgccccgcgc cgctcgcgcc cttcttccgc 4080  
 tgcgcttgcg cgcagggctg gaccgggccc cgctgcgagg cgcccgcgc ggcacccgag 4140  
 gtctcggagg agccgcgaga tctgggccc ggcgagccca aatcttgtga caaaactcac 4200  
 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 4260  
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 4320  
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 4380  
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 4440  
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggctctc 4500  
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 4560  
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 4620  
 ctgacctgcc tggtaaaggt cttctatccc agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat 4680  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 4740  
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 4800  
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 4860  
 ccgggtaaat ga 4872

ES 2 532 405 T3

<210> 32  
 <211> 1623  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 32

Met Gly Pro Gly Ala Arg Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Met Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Arg Ala Leu Pro Leu Leu Leu Leu  
 20 25 30  
 Leu Ala Gly Pro Gly Ala Ala Ala Pro Pro Cys Leu Asp Gly Ser Pro  
 35 40 45  
 Cys Ala Asn Gly Gly Arg Cys Thr Gln Leu Pro Ser Arg Glu Ala Ala  
 50 55 60  
 Cys Leu Cys Pro Pro Gly Trp Val Gly Glu Arg Cys Gln Leu Glu Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Cys His Ser Gly Pro Cys Ala Gly Arg Gly Val Cys Gln Ser Ser  
 85 90 95  
 Val Val Ala Gly Thr Ala Arg Phe Ser Cys Arg Cys Pro Arg Gly Phe  
 100 105 110  
 Arg Gly Pro Asp Cys Ser Leu Pro Asp Pro Cys Leu Ser Ser Pro Cys  
 115 120 125  
 Ala His Gly Ala Arg Cys Ser Val Gly Pro Asp Gly Arg Phe Leu Cys  
 130 135 140  
 Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Gln Gly Arg Ser Cys Arg Ser Asp Val Asp  
 145 150 155 160  
 Glu Cys Arg Val Gly Glu Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Leu Asn  
 165 170 175  
 Thr Pro Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Gly Pro  
 180 185 190

ES 2 532 405 T3

Leu Cys Glu Asn Pro Ala Val Pro Cys Ala Pro Ser Pro Cys Arg Asn  
 195 200 205  
 Gly Gly Thr Cys Arg Gln Ser Gly Asp Leu Thr Tyr Asp Cys Ala Cys  
 210 215 220  
 Leu Pro Gly Phe Glu Gly Gln Asn Cys Glu Val Asn Val Asp Asp Cys  
 225 230 235  
 Pro Gly His Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Val Asn  
 245 250 255  
 Thr Tyr Asn Cys Gln Cys Pro Pro Glu Trp Thr Gly Gln Phe Cys Thr  
 260 265 270  
 Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Gln Pro Asn Ala Cys His Asn Gly  
 275 280 285  
 Gly Thr Cys Phe Asn Thr Leu Gly Gly His Ser Cys Val Cys Val Asn  
 290 295 300  
 Gly Trp Thr Gly Glu Ser Cys Ser Gln Asn Ile Asp Asp Cys Ala Thr  
 305 310 315  
 Ala Val Cys Phe His Gly Ala Thr Cys His Asp Arg Val Ala Ser Phe  
 325 330 335  
 Tyr Cys Ala Cys Pro Met Gly Lys Thr Gly Leu Leu Cys His Leu Asp  
 340 345 350  
 Asp Ala Cys Val Ser Asn Pro Cys His Glu Asp Ala Ile Cys Asp Thr  
 355 360 365  
 Asn Pro Val Asn Gly Arg Ala Ile Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Thr  
 370 375 380  
 Gly Gly Ala Cys Asp Gln Asp Val Asp Glu Cys Ser Ile Gly Ala Asn  
 385 390 395  
 Pro Cys Glu His Leu Gly Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Ser Phe Leu  
 405 410 415  
 Cys Gln Cys Gly Arg Gly Tyr Thr Gly Pro Arg Cys Glu Thr Asp Val  
 420 425 430  
 Asn Glu Cys Leu Ser Gly Pro Cys Arg Asn Gln Ala Thr Cys Leu Asp  
 435 440 445  
 Arg Ile Gly Gln Phe Thr Cys Ile Cys Met Ala Gly Phe Thr Gly Thr  
 450 455 460

ES 2 532 405 T3

Tyr Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Gln Ser Ser Pro Cys Val Asn  
 465 470 475 480  
 Gly Gly Val Cys Lys Asp Arg Val Asn Gly Phe Ser Cys Thr Cys Pro  
 485 490 495  
 Ser Gly Phe Ser Gly Ser Thr Cys Gln Leu Asp Val Asp Glu Cys Ala  
 500 505 510  
 Ser Thr Pro Cys Arg Asn Gly Ala Lys Cys Val Asp Gln Pro Asp Gly  
 515 520 525  
 Tyr Glu Cys Arg Cys Ala Glu Gly Phe Glu Gly Thr Leu Cys Asp Arg  
 530 535 540  
 Asn Val Asp Asp Cys Ser Pro Asp Pro Cys His His Gly Arg Cys Val  
 545 550 555 560  
 Asp Gly Ile Ala Ser Phe Ser Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Thr Gly  
 565 570 575  
 Thr Arg Cys Glu Ser Gln Val Asp Glu Cys Arg Ser Gln Pro Cys Arg  
 580 585 590  
 His Gly Gly Lys Cys Leu Asp Leu Val Asp Lys Tyr Leu Cys Arg Cys  
 595 600 605  
 Pro Ser Gly Thr Thr Gly Val Asn Cys Glu Val Asn Ile Asp Asp Cys  
 610 615 620  
 Ala Ser Asn Pro Cys Thr Phe Gly Val Cys Arg Asp Gly Ile Asn Arg  
 625 630 635 640  
 Tyr Asp Cys Val Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Pro Leu Cys Asn Val  
 645 650 655  
 Glu Ile Asn Glu Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gly Glu Gly Gly Ser Cys  
 660 665 670  
 Val Asp Gly Glu Asn Gly Phe Arg Cys Leu Cys Pro Pro Gly Ser Leu  
 675 680 685  
 Pro Pro Leu Cys Leu Pro Pro Ser His Pro Cys Ala His Glu Pro Cys  
 690 695 700  
 Ser His Gly Ile Cys Tyr Asp Ala Pro Gly Gly Phe Arg Cys Val Cys  
 705 710 715 720  
 Glu Pro Gly Trp Ser Gly Pro Arg Cys Ser Gln Ser Leu Ala Arg Asp

ES 2 532 405 T3

| 725        |            |            |            |            | 730        |            |            |            |            | 735        |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ala        | Cys        | Glu        | Ser<br>740 | Gln        | Pro        | Cys        | Arg        | Ala<br>745 | Gly        | Gly        | Thr        | Cys        | Ser<br>750 | Ser        | Asp        |
| Gly        | Met        | Gly<br>755 | Phe        | His        | Cys        | Thr        | Cys<br>760 | Pro        | Pro        | Gly        | Val        | Gln<br>765 | Gly        | Arg        | Gln        |
| Cys        | Glu<br>770 | Leu        | Leu        | Ser        | Pro        | Cys<br>775 | Thr        | Pro        | Asn        | Pro        | Cys<br>780 | Glu        | His        | Gly        | Gly        |
| Arg<br>785 | Cys        | Glu        | Ser        | Ala        | Pro<br>790 | Gly        | Gln        | Leu        | Pro        | Val<br>795 | Cys        | Ser        | Cys        | Pro        | Gln<br>800 |
| Gly        | Trp        | Gln        | Gly        | Pro<br>805 | Arg        | Cys        | Gln        | Gln        | Asp<br>810 | Val        | Asp        | Glu        | Cys        | Ala<br>815 | Gly        |
| Pro        | Ala        | Pro        | Cys<br>820 | Gly        | Pro        | His        | Gly        | Ile<br>825 | Cys        | Thr        | Asn        | Leu        | Ala<br>830 | Gly        | Ser        |
| Phe        | Ser        | Cys<br>835 | Thr        | Cys        | His        | Gly        | Gly<br>840 | Tyr        | Thr        | Gly        | Pro        | Ser<br>845 | Cys        | Asp        | Gln        |
| Asp        | Ile<br>850 | Asn        | Asp        | Cys        | Asp        | Pro<br>855 | Asn        | Pro        | Cys        | Leu        | Asn<br>860 | Gly        | Gly        | Ser        | Cys        |
| Gln<br>865 | Asp        | Gly        | Val        | Gly        | Ser<br>870 | Phe        | Ser        | Cys        | Ser        | Cys<br>875 | Leu        | Pro        | Gly        | Phe        | Ala<br>880 |
| Gly        | Pro        | Arg        | Cys        | Ala<br>885 | Arg        | Asp        | Val        | Asp        | Glu<br>890 | Cys        | Leu        | Ser        | Asn        | Pro        | Cys<br>895 |
| Gly        | Pro        | Gly        | Thr<br>900 | Cys        | Thr        | Asp        | His        | Val<br>905 | Ala        | Ser        | Phe        | Thr        | Cys<br>910 | Thr        | Cys        |
| Pro        | Pro        | Gly<br>915 | Tyr        | Gly        | Gly        | Phe        | His<br>920 | Cys        | Glu        | Gln        | Asp        | Leu<br>925 | Pro        | Asp        | Cys        |
| Ser        | Pro<br>930 | Ser        | Ser        | Cys        | Phe        | Asn<br>935 | Gly        | Gly        | Thr        | Cys        | Val<br>940 | Asp        | Gly        | Val        | Asn        |
| Ser<br>945 | Phe        | Ser        | Cys        | Leu        | Cys<br>950 | Arg        | Pro        | Gly        | Tyr        | Thr<br>955 | Gly        | Ala        | His        | Cys        | Gln<br>960 |
| His        | Glu        | Ala        | Asp        | Pro<br>965 | Cys        | Leu        | Ser        | Arg        | Pro<br>970 | Cys        | Leu        | His        | Gly        | Gly<br>975 | Val        |
| Cys        | Ser        | Ala        | Ala<br>980 | His        | Pro        | Gly        | Phe        | Arg<br>985 | Cys        | Thr        | Cys        | Leu        | Glu<br>990 | Ser        | Phe        |

ES 2 532 405 T3

Thr Gly Pro Gln Cys Gln Thr Leu Val Asp Trp Cys Ser Arg Gln Pro  
 995 1000 1005

Cys Gln Asn Gly Gly Arg Cys Val Gln Thr Gly Ala Tyr Cys Leu  
 1010 1015 1020

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Arg Leu Cys Asp Ile Arg Ser Leu  
 1025 1030 1035

Pro Cys Arg Glu Ala Ala Ala Gln Ile Gly Val Arg Leu Glu Gln  
 1040 1045 1050

Leu Cys Gln Ala Gly Gly Gln Cys Val Asp Glu Asp Ser Ser His  
 1055 1060 1065

Tyr Cys Val Cys Pro Glu Gly Arg Thr Gly Ser His Cys Glu Gln  
 1070 1075 1080

Glu Val Asp Pro Cys Leu Ala Gln Pro Cys Gln His Gly Gly Thr  
 1085 1090 1095

Cys Arg Gly Tyr Met Gly Gly Tyr Met Cys Glu Cys Leu Pro Gly  
 1100 1105 1110

Tyr Asn Gly Asp Asn Cys Glu Asp Asp Val Asp Glu Cys Ala Ser  
 1115 1120 1125

Gln Pro Cys Gln His Gly Gly Ser Cys Ile Asp Leu Val Ala Arg  
 1130 1135 1140

Tyr Leu Cys Ser Cys Pro Pro Gly Thr Leu Gly Val Leu Cys Glu  
 1145 1150 1155

Ile Asn Glu Asp Asp Cys Gly Pro Gly Pro Pro Leu Asp Ser Gly  
 1160 1165 1170

Pro Arg Cys Leu His Asn Gly Thr Cys Val Asp Leu Val Gly Gly  
 1175 1180 1185

Phe Arg Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Leu Arg Cys Glu  
 1190 1195 1200

Ala Asp Ile Asn Glu Cys Arg Ser Gly Ala Cys His Ala Ala His  
 1205 1210 1215

Thr Arg Asp Cys Leu Gln Asp Pro Gly Gly Gly Phe Arg Cys Leu  
 1220 1225 1230

Cys His Ala Gly Phe Ser Gly Pro Arg Cys Gln Thr Val Leu Ser  
 1235 1240 1245

ES 2 532 405 T3

Pro Cys Glu Ser Gln Pro Cys Gln His Gly Gly Gln Cys Arg Pro  
 1250 1255 1260  
 Ser Pro Gly Pro Gly Gly Gly Leu Thr Phe Thr Cys His Cys Ala  
 1265 1270 1275  
 Gln Pro Phe Trp Gly Pro Arg Cys Glu Arg Val Ala Arg Ser Cys  
 1280 1285 1290  
 Arg Glu Leu Gln Cys Pro Val Gly Val Pro Cys Gln Gln Thr Pro  
 1295 1300 1305  
 Arg Gly Pro Arg Cys Ala Cys Pro Pro Gly Leu Ser Gly Pro Ser  
 1310 1315 1320  
 Cys Arg Ser Phe Pro Gly Ser Pro Pro Gly Ala Ser Asn Ala Ser  
 1325 1330 1335  
 Cys Ala Ala Ala Pro Cys Leu His Gly Gly Ser Cys Arg Pro Ala  
 1340 1345 1350  
 Pro Leu Ala Pro Phe Phe Arg Cys Ala Cys Ala Gln Gly Trp Thr  
 1355 1360 1365  
 Gly Pro Arg Cys Glu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Glu Val Ser Glu  
 1370 1375 1380  
 Glu Pro Arg Asp Leu Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 1385 1390 1395  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 1400 1405 1410  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 1415 1420 1425  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 1430 1435 1440  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 1445 1450 1455  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 1460 1465 1470  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 1475 1480 1485  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 1490 1495 1500

ES 2 532 405 T3

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
1505 1510 1515

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
1520 1525 1530

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
1535 1540 1545

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
1550 1555 1560

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
1565 1570 1575

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
1580 1585 1590

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
1595 1600 1605

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
1610 1615 1620

<210> 33

<211> 1605

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Trp Gly Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala  
1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Pro Cys Leu Asp Gly Ser Pro Cys Ala  
20 25 30

Asn Gly Gly Arg Cys Thr Gln Leu Pro Ser Arg Glu Ala Ala Cys Leu  
35 40 45

Cys Pro Pro Gly Trp Val Gly Glu Arg Cys Gln Leu Glu Asp Pro Cys  
50 55 60

His Ser Gly Pro Cys Ala Gly Arg Gly Val Cys Gln Ser Ser Val Val  
65 70 75 80

Ala Gly Thr Ala Arg Phe Ser Cys Arg Cys Pro Arg Gly Phe Arg Gly  
85 90 95

Pro Asp Cys Ser Leu Pro Asp Pro Cys Leu Ser Ser Pro Cys Ala His  
100 105 110

10

ES 2 532 405 T3

Gly Ala Arg Cys Ser Val Gly Pro Asp Gly Arg Phe Leu Cys Ser Cys  
 115 120 125  
 Pro Pro Gly Tyr Gln Gly Arg Ser Cys Arg Ser Asp Val Asp Glu Cys  
 130 135 140  
 Arg Val Gly Glu Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Leu Asn Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Phe Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Gly Pro Leu Cys  
 165 170 175  
 Glu Asn Pro Ala Val Pro Cys Ala Pro Ser Pro Cys Arg Asn Gly Gly  
 180 185 190  
 Thr Cys Arg Gln Ser Gly Asp Leu Thr Tyr Asp Cys Ala Cys Leu Pro  
 195 200 205  
 Gly Phe Glu Gly Gln Asn Cys Glu Val Asn Val Asp Asp Cys Pro Gly  
 210 215 220  
 His Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr  
 225 230 235 240  
 Asn Cys Gln Cys Pro Pro Glu Trp Thr Gly Gln Phe Cys Thr Glu Asp  
 245 250 255  
 Val Asp Glu Cys Gln Leu Gln Pro Asn Ala Cys His Asn Gly Gly Thr  
 260 265 270  
 Cys Phe Asn Thr Leu Gly Gly His Ser Cys Val Cys Val Asn Gly Trp  
 275 280 285  
 Thr Gly Glu Ser Cys Ser Gln Asn Ile Asp Asp Cys Ala Thr Ala Val  
 290 295 300  
 Cys Phe His Gly Ala Thr Cys His Asp Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys  
 305 310 315 320  
 Ala Cys Pro Met Gly Lys Thr Gly Leu Leu Cys His Leu Asp Asp Ala  
 325 330 335  
 Cys Val Ser Asn Pro Cys His Glu Asp Ala Ile Cys Asp Thr Asn Pro  
 340 345 350  
 Val Asn Gly Arg Ala Ile Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Gly  
 355 360 365  
 Ala Cys Asp Gln Asp Val Asp Glu Cys Ser Ile Gly Ala Asn Pro Cys



ES 2 532 405 T3

Asn Glu Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gly Glu Gly Gly Ser Cys Val Asp  
 645 650 655  
 Gly Glu Asn Gly Phe Arg Cys Leu Cys Pro Pro Gly Ser Leu Pro Pro  
 660 665 670  
 Leu Cys Leu Pro Pro Ser His Pro Cys Ala His Glu Pro Cys Ser His  
 675 680 685  
 Gly Ile Cys Tyr Asp Ala Pro Gly Gly Phe Arg Cys Val Cys Glu Pro  
 690 695 700  
 Gly Trp Ser Gly Pro Arg Cys Ser Gln Ser Leu Ala Arg Asp Ala Cys  
 705 710 715 720  
 Glu Ser Gln Pro Cys Arg Ala Gly Gly Thr Cys Ser Ser Asp Gly Met  
 725 730 735  
 Gly Phe His Cys Thr Cys Pro Pro Gly Val Gln Gly Arg Gln Cys Glu  
 740 745 750  
 Leu Leu Ser Pro Cys Thr Pro Asn Pro Cys Glu His Gly Gly Arg Cys  
 755 760 765  
 Glu Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Val Cys Ser Cys Pro Gln Gly Trp  
 770 775 780  
 Gln Gly Pro Arg Cys Gln Gln Asp Val Asp Glu Cys Ala Gly Pro Ala  
 785 790 795 800  
 Pro Cys Gly Pro His Gly Ile Cys Thr Asn Leu Ala Gly Ser Phe Ser  
 805 810 815  
 Cys Thr Cys His Gly Gly Tyr Thr Gly Pro Ser Cys Asp Gln Asp Ile  
 820 825 830  
 Asn Asp Cys Asp Pro Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Gln Asp  
 835 840 845  
 Gly Val Gly Ser Phe Ser Cys Ser Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Pro  
 850 855 860  
 Arg Cys Ala Arg Asp Val Asp Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Gly Pro  
 865 870 875 880  
 Gly Thr Cys Thr Asp His Val Ala Ser Phe Thr Cys Thr Cys Pro Pro  
 885 890 895  
 Gly Tyr Gly Gly Phe His Cys Glu Gln Asp Leu Pro Asp Cys Ser Pro  
 900 905 910

ES 2 532 405 T3

Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Val Asn Ser Phe  
 915 920 925

Ser Cys Leu Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Ala His Cys Gln His Glu  
 930 935 940

Ala Asp Pro Cys Leu Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Val Cys Ser  
 945 950 955 960

Ala Ala His Pro Gly Phe Arg Cys Thr Cys Leu Glu Ser Phe Thr Gly  
 965 970 975

Pro Gln Cys Gln Thr Leu Val Asp Trp Cys Ser Arg Gln Pro Cys Gln  
 980 985 990

Asn Gly Gly Arg Cys Val Gln Thr Gly Ala Tyr Cys Leu Cys Pro Pro  
 995 1000 1005

Gly Trp Ser Gly Arg Leu Cys Asp Ile Arg Ser Leu Pro Cys Arg  
 1010 1015 1020

Glu Ala Ala Ala Gln Ile Gly Val Arg Leu Glu Gln Leu Cys Gln  
 1025 1030 1035

Ala Gly Gly Gln Cys Val Asp Glu Asp Ser Ser His Tyr Cys Val  
 1040 1045 1050

Cys Pro Glu Gly Arg Thr Gly Ser His Cys Glu Gln Glu Val Asp  
 1055 1060 1065

Pro Cys Leu Ala Gln Pro Cys Gln His Gly Gly Thr Cys Arg Gly  
 1070 1075 1080

Tyr Met Gly Gly Tyr Met Cys Glu Cys Leu Pro Gly Tyr Asn Gly  
 1085 1090 1095

Asp Asn Cys Glu Asp Asp Val Asp Glu Cys Ala Ser Gln Pro Cys  
 1100 1105 1110

Gln His Gly Gly Ser Cys Ile Asp Leu Val Ala Arg Tyr Leu Cys  
 1115 1120 1125

Ser Cys Pro Pro Gly Thr Leu Gly Val Leu Cys Glu Ile Asn Glu  
 1130 1135 1140

Asp Asp Cys Gly Pro Gly Pro Pro Leu Asp Ser Gly Pro Arg Cys  
 1145 1150 1155

Leu His Asn Gly Thr Cys Val Asp Leu Val Gly Gly Phe Arg Cys  
 1160 1165 1170

ES 2 532 405 T3

Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Leu Arg Cys Glu Ala Asp Ile  
 1175 1180 1185  
 Asn Glu Cys Arg Ser Gly Ala Cys His Ala Ala His Thr Arg Asp  
 1190 1195 1200  
 Cys Leu Gln Asp Pro Gly Gly Gly Phe Arg Cys Leu Cys His Ala  
 1205 1210 1215  
 Gly Phe Ser Gly Pro Arg Cys Gln Thr Val Leu Ser Pro Cys Glu  
 1220 1225 1230  
 Ser Gln Pro Cys Gln His Gly Gly Gln Cys Arg Pro Ser Pro Gly  
 1235 1240 1245  
 Pro Gly Gly Gly Leu Thr Phe Thr Cys His Cys Ala Gln Pro Phe  
 1250 1255 1260  
 Trp Gly Pro Arg Cys Glu Arg Val Ala Arg Ser Cys Arg Glu Leu  
 1265 1270 1275  
 Gln Cys Pro Val Gly Val Pro Cys Gln Gln Thr Pro Arg Gly Pro  
 1280 1285 1290  
 Arg Cys Ala Cys Pro Pro Gly Leu Ser Gly Pro Ser Cys Arg Ser  
 1295 1300 1305  
 Phe Pro Gly Ser Pro Pro Gly Ala Ser Asn Ala Ser Cys Ala Ala  
 1310 1315 1320  
 Ala Pro Cys Leu His Gly Gly Ser Cys Arg Pro Ala Pro Leu Ala  
 1325 1330 1335  
 Pro Phe Phe Arg Cys Ala Cys Ala Gln Gly Trp Thr Gly Pro Arg  
 1340 1345 1350  
 Cys Glu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Glu Val Ser Glu Glu Pro Arg  
 1355 1360 1365  
 Asp Leu Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 1370 1375 1380  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 1385 1390 1395  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 1400 1405 1410  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp



ES 2 532 405 T3

ctgccagatc cctgcctcag cagcccttgt gcccacggtg cccgctgctc agtggggccc 360  
 gatggacgct tcctctgctc ctgccacct ggctaccagg gccgcagctg ccgaagcgac 420  
 gtggatgagt gccgggtggg tgagccctgc cgccatggtg gcacctgcct caacacacct 480  
 ggctccttcc gctgccagtg tccagctggc tacacagggc cactatgtga gaaccccgcg 540  
 gtgccctgtg cgccctcacc atgccgtaac gggggcacct gcaggcagag tggcgacctc 600  
 acttacgact gtgcctgtct tcctgggttt gagggtcaga attgtgaagt gaacgtggac 660  
 gactgtccag gacaccgatg tctcaatggg gggacatgcg tggatggcgt caacacctat 720  
 aactgccagt gccctcctga gtggacaggg cagttctgca cggaggacgt ggatgagtgt 780  
 cagctgcagc ccaacgcctg ccacaatggg ggtacctgct tcaacacgct gggtgccac 840  
 agctgcgtgt gtgtcaatgg ctggacaggg gagagctgca gtcagaatat cgatgactgt 900  
 gccacagccg tgtgcttcca tggggccacc tgccatgacc gcgtggcttc tttctactgt 960  
 gcctgccccca tgggcaagac tggcctcctg tgtcacctgg atgacgcctg tgtcagcaac 1020  
 ccctgccacg aggatgctat ctgtgacaca aatccggtga acggccgggc catttgacac 1080  
 tgtcctcccg gcttcacggg tggggcatgt gaccaggatg tggacgagtg ctctatcggc 1140  
 gccaaccctt gcgagcactt gggcaggtgc gtgaacacgc agggctcctt cctgtgccag 1200  
 tgcggtcgtg gctacactgg acctcgtgt gagaccgatg tcaacgagtg tctgtcgggg 1260  
 ccctgcccga accagggcac gtgcctcgac cgcataggcc agttcacctg tatctgtatg 1320  
 gcaggcttca caggaacctt ttgcgaggtg gacattgacg agtgtcagag tagcccctgt 1380  
 gtcaacgggtg gggcttgcaa ggaccgagtc aatggcttca gctgcacctg cccctcgggc 1440  
 ttcagcggct ccacgtgtca gctggacgtg gacgaatgcy ccagcacgcc ctgcaggaat 1500  
 ggcgccaaat gcgtggacca gcccgatggc tacgagtgcc gctgtgccga gggctttgag 1560  
 ggcacgctgt gtgatcgcaa cgtggacgac tgcctcccctg acccatgcca ccatggtcgc 1620  
 tgcgtggatg gcatcgccag cttctcatgt gcctgtgctc ctggctacac gggcacacgc 1680  
 tgcgagagcc aggtggacga atgccgcagc cagccctgcc gccatggcgg caaatgccta 1740  
 gacctggtgg acaagtacct ctgccgctgc ctttctggga ccacaggtgt gaactgcgaa 1800  
 gtgaacattg acgactgtgc cagcaacccc tgcaccttg gagtctgccc tgatggcatc 1860  
 aaccgctacg actgtgtctg ccaacctggc ttcacagggc ccctttgtaa cgtggagatc 1920  
 aatgagtgtg cttccagccc atgcggcgag ggaggttcct gtgtggatgg ggaaaatggc 1980  
 ttccgctgcc tctgcccgcc tggctccttg cccccactct gcctcccccc gagccatccc 2040  
 tgtgcccctg agccctgcag tcacggcatc tgctatgatg cacctggcgg gttccgctgt 2100  
 gtgtgtgagc ctggctggag tggccccgcg tgcagccaga gcctggcccg agacgcctgt 2160  
 gagtcccagc cgtgcagggc cggtgggaca tgcagcagcg atggaatggg tttccactgc 2220  
 acctgcccgc ctgggtgtcca gggacgtcag tgtgaactcc tctccccctg caccgccaac 2280  
 ccctgtgagc atgggggccc ctgcgagtct gcccctggcc agctgcctgt ctgctcctgc 2340

ES 2 532 405 T3

ccccagggtt ggcaaggccc acgatgccag caggatgtgg acgagtgtgc tggccccgca 2400  
ccctgtggcc ctcatggtat ctgcaccaac ctggcagggg gtttcagctg cacctgccat 2460  
ggagggtaca ctggcccttc ctgtgatcag gacatcaatg actgtgacct caacctatgc 2520  
ctgaacgggtg gctcgtgcca agacggcgtg ggctcctttt cctgctcctg cctccctggt 2580  
ttcgccggcc cacgatgcgc ccgcgatgtg gatgagtgcc tgagcaacct ctgcggcccc 2640  
ggcacctgta ccgaccacgt ggctccttc acctgcacct gcccgccagg ctacggaggc 2700  
ttccactgcg aacaggacct gcccgactgc agccccagct cctgcttcaa tggcgggacc 2760  
tgtgtggacg gcgtgaactc gttcagctgc ctgtgccgtc ccggctacac aggagcccac 2820  
tgccaacatg aggcagacct ctgcctctcg cggccctgcc tacacggggg cgtctgcagc 2880  
gccgcccacc ctggcttccg ctgcacctgc ctcgagagct tcacggggcc gcagtgccag 2940  
acgctgggtg attggtgcag ccgccagcct tgtcaaaacg ggggtcgctg cgtccagact 3000  
ggggcctatt gcctttgtcc ccctggatgg agcggacgcc tctgtgacat ccgaagcttg 3060  
ccctgcaggg aggccgcagc ccagatcggg gtgctggctgg agcagctgtg tcaggcgggt 3120  
gggcagtgtg tggatgaaga cagctcccac tactgctgtg gccagaggg ccgtactggt 3180  
agccactgtg agcaggaggt ggaccctgc ttggcccagc cctgccagca tggggggacc 3240  
tgccgtggct atatgggggg ctacatgtgt gagtgtcttc ctggctacaa tggtgataac 3300  
tgtgaggacg acgtggacga gtgtgcctcc cagccctgcc agcacggggg ttcattgcatt 3360  
gacctcgtgg cccgctatct ctgctcctgt cccccaggaa cgctgggggt gctctgcgag 3420  
attaatgagg atgactgcgg cccaggccca ccgctggact cagggccccg gtgcctacac 3480  
aatggcacct gcgtggacct ggtgggtggt ttccgctgca cctgtcccc aggatacact 3540  
ggtttgcgct gcgaggcaga catcaatgag tgtcgctcag gtgcctgcca cgcggcacac 3600  
acccgggact gcctgcagga cccaggcgga ggtttccggt gcctttgtca tgctggcttc 3660  
tcaggctctc gctgtcagac tgtcctgtct ccctgcgagt cccagccatg ccagcatgga 3720  
ggcagtgcc gtcctagccc gggctcctggg ggtgggctga ccttcacctg tcaactgtgc 3780  
cagccgttct ggggtccgcg ttgcgagcgg gtggcgcgct cctgccggga gctgcagtgc 3840  
ccggtggcg tccatgcca gcagacgccc cgcgggccgc gctgcgctg cccccaggg 3900  
ttgtcgggac cctcctgccg cagcttcccg ggtcgcgcgc cgggggcccag caacgccagc 3960  
tgcgcggccg cccctgtct ccacgggggc tcctgccgcc ccgcgccgct cgcgcccttc 4020  
ttccgctgcg cttgcgcgca gggctggacc gggccgcgct gcgaggcgc cgcgcggca 4080  
cccgaggtct cggaggagcc gcgagatctg ggcccggcg agcccaaac ttgtgacaaa 4140  
actcacacat gccaccgctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgct agtcttcctc 4200  
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 4260  
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 4320

ES 2 532 405 T3

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt<sup>-</sup>acaacagcac gtaccgtgtg 4380  
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 4440  
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 4500  
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 4560  
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 4620  
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 4680  
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 4740  
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 4800  
ctgtctccgg gtaaatga 4818

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión cuya secuencia (a) es idéntica a la secuencia de las repeticiones 1-X de EGF del dominio extracelular de la proteína receptora de Notch3 humana en la que X es cualquier número entero de 1 a 10 o de 12 a 33, seguido de (b) una secuencia idéntica a la secuencia de una parte Fc de un anticuerpo, en la que (b) está localizada en el lado carboxi terminal de (a) y en la que (b) está unida a (a) bien directamente o mediante un conector.
- 10 2. Una proteína de fusión que comprende la secuencia que (a) es idéntica a la secuencia de las repeticiones de EGF del dominio extracelular de la proteína receptora de Notch3 humana, en la que están presentes X repeticiones de EGF, en la que X es cualquier número entero de 12 a 33 seguido de (b) una secuencia idéntica a la secuencia de una parte Fc de un anticuerpo, en la que (b) está localizada en el lado carboxi terminal de (a) y en la que (b) está unida a (a) bien directamente o mediante un conector.
3. La proteína de fusión de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la parte Fc del anticuerpo es la parte Fc de un anticuerpo humano.
- 15 4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que (b) está unida a (a) mediante una secuencia conectora.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 3, en la que (b) está unida directamente a (a).
6. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de un trastorno metabólico.
7. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de un tumor.
- 20 8. La proteína de fusión de la reivindicación 7, en la que el tumor es un cáncer de ovario o un cáncer de mama.
9. La proteína de fusión de la reivindicación 6, en la que el trastorno metabólico es diabetes, obesidad, aterosclerosis, isquemia, ictus, o enfermedad cardiovascular.
- 25 10. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en la inhibición de la angiogénesis, linfangiogénesis fisiológica, linfangiogénesis patológica, metástasis tumoral, crecimiento de un tumor secundario, o coopción de vasos sanguíneos.
- 30 11. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer en el que la proteína de fusión se va a administrar además de (i) un inhibidor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), (ii) un inhibidor del receptor de VEGF, (iii) un inhibidor de PDGF, (iv) un antagonista del receptor de PDGF, o (v) un inhibidor de HER2/neu.
12. La proteína de fusión de la reivindicación 11, en la que el inhibidor de VEGF es un inhibidor de VEGF-A, PGIF, VEGF-B, VEGF-C, o VEGF-D.
13. La proteína de fusión de la reivindicación 11, en la que el inhibidor del receptor de VEGF es un inhibidor de VEGFR-1 o un inhibidor de VEGFR-2.
- 35 14. La proteína de fusión de la reivindicación 11, en la que el inhibidor de PDGF es un inhibidor de PDGF-A o un inhibidor de PDGF-B.
15. La proteína de fusión de la reivindicación 11, en la que el antagonista del receptor de PDGF es un antagonista del receptor de PDGF B.

Figura 1

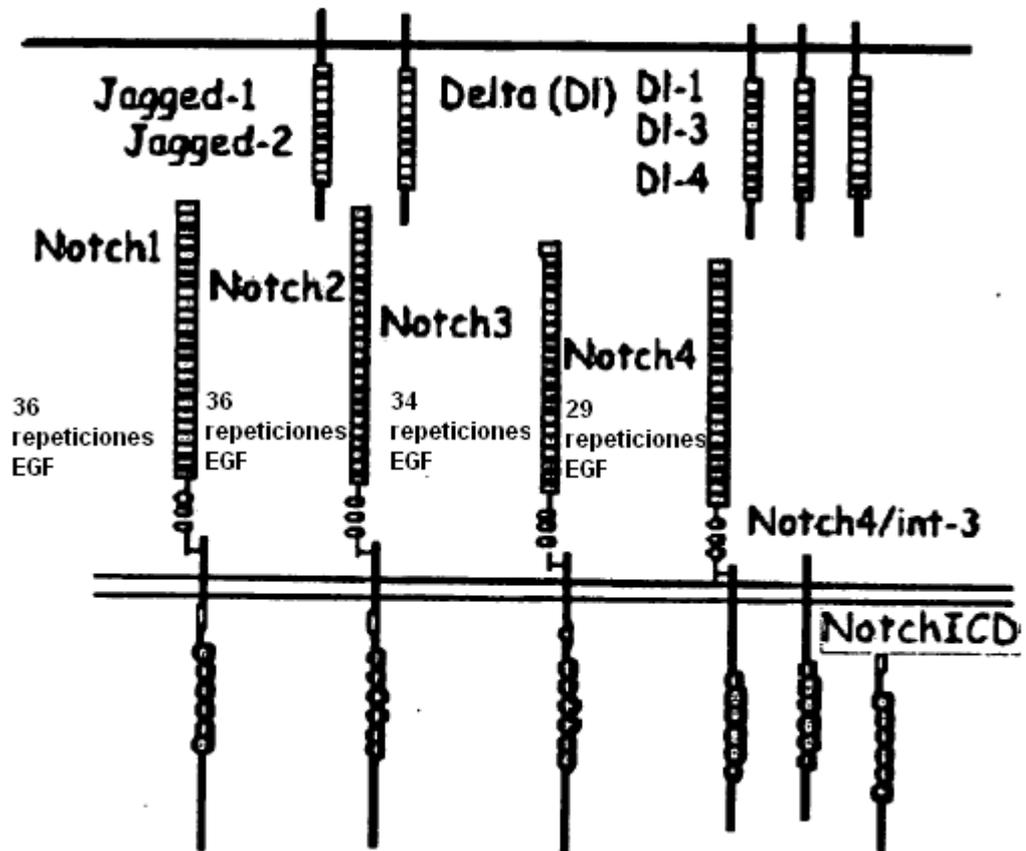


Figura 2

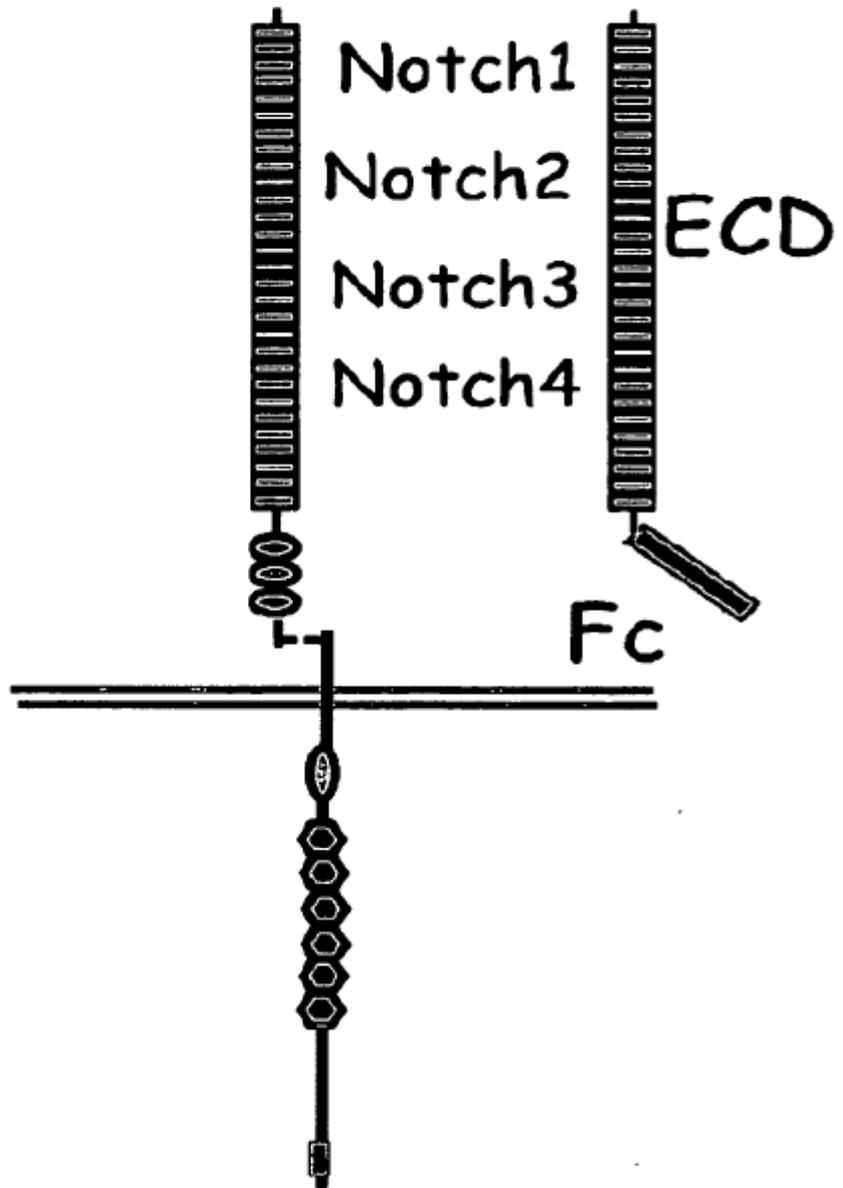


Figura 3

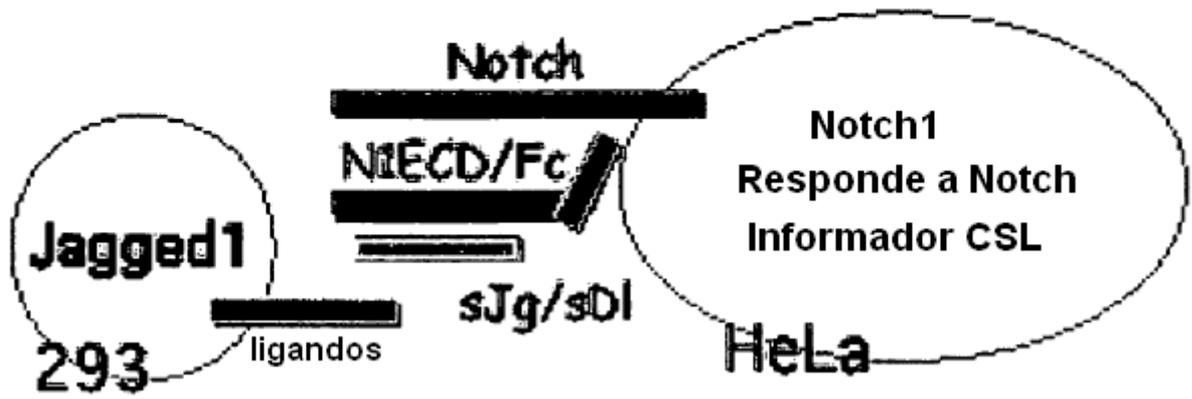


Figura 4

**Ectodominio Notch (trampa Notch) inhibe la activación inducida por ligando de la señalización de Notch**

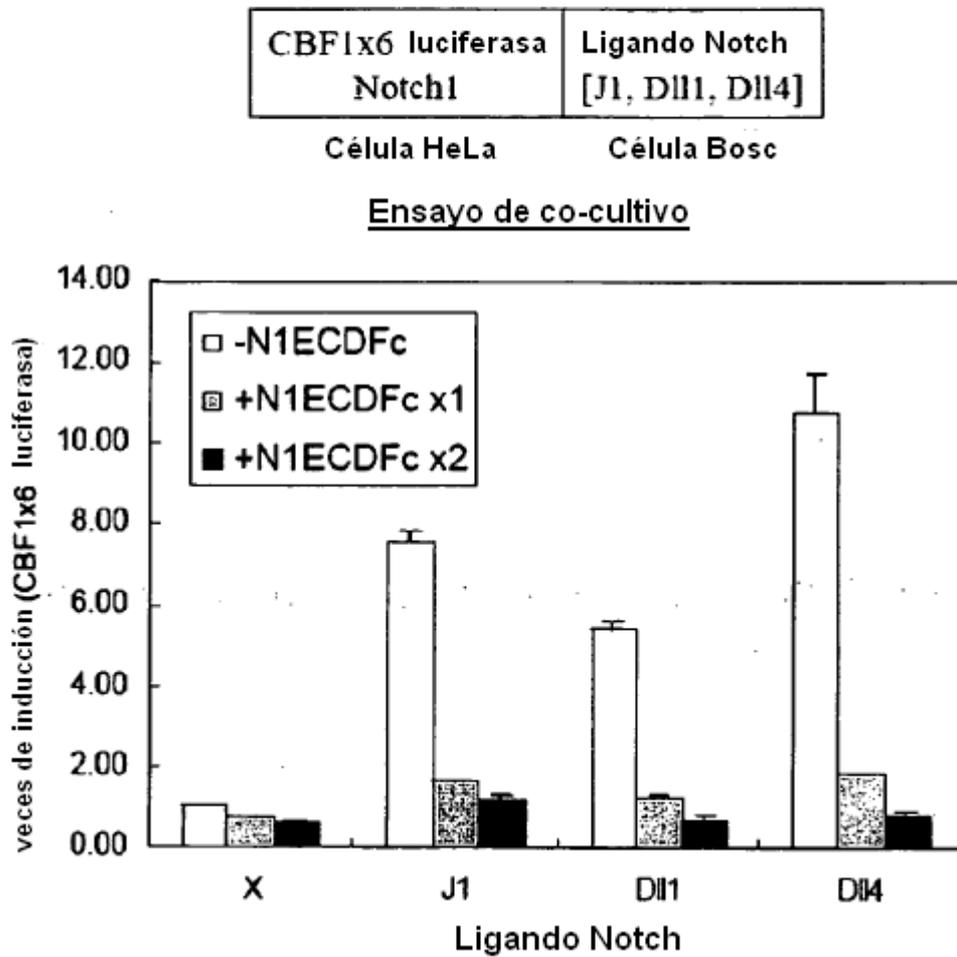


Figura 5

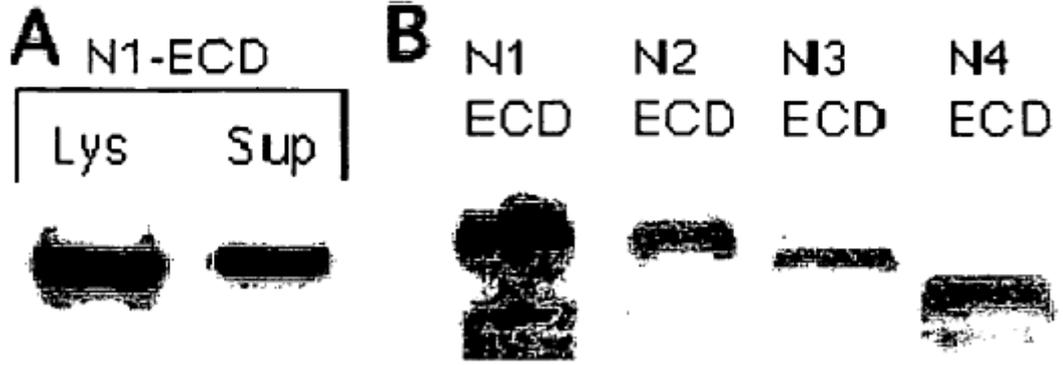


Figura 6

**Activación de la señalización de Notch en HUVEC infectadas con adenoviral que codifica VEGF-165**

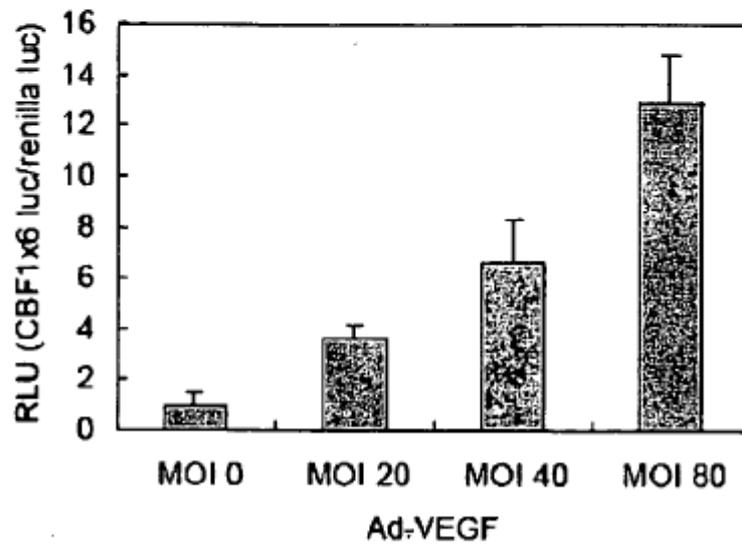
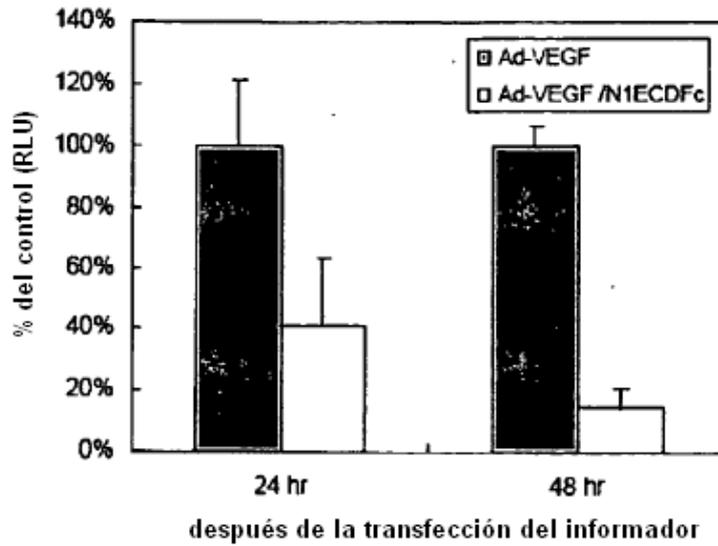


Figura 7

Ectodominio de Notch (Señuelo Notch) inhibe la activación de la señalización Notch inducida por estimulación de VEGF en HUVEC infectadas con adenovirus

(a) tiempo



(b) MOI

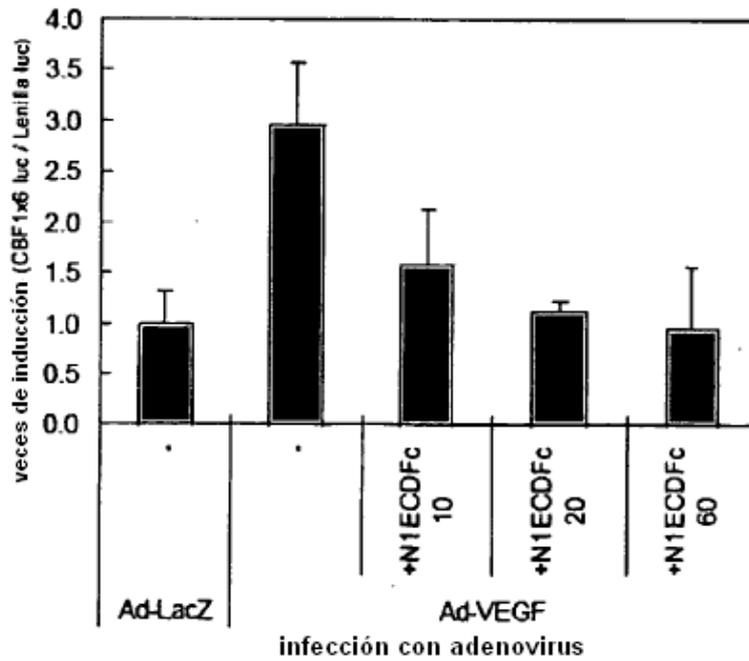


Figura 8

**El señuelo Notch inhibe la gemación de HUVEC inducida por la sobreexpresión de VEGF en gel de colágeno de tipo I**

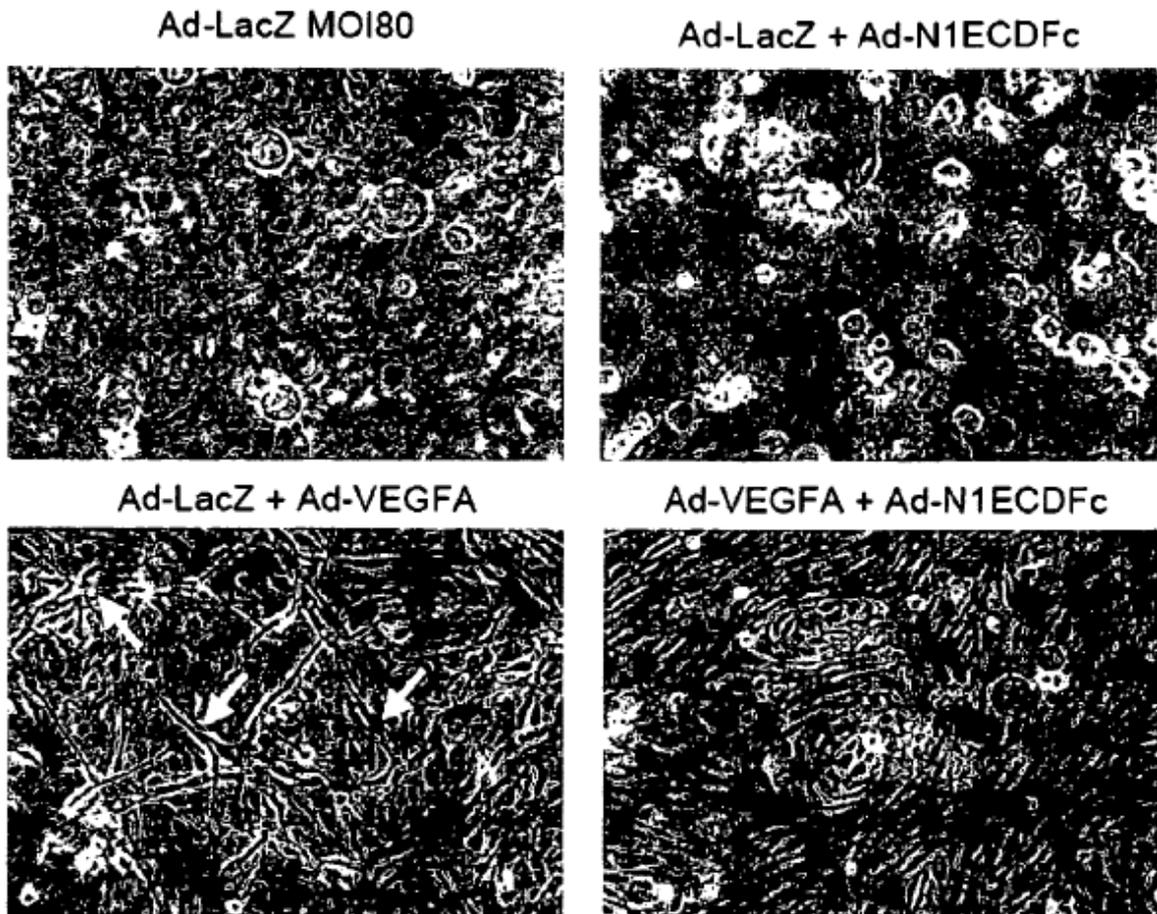


Figura 9

**La trampa de Notch inhibe la gemación de HUVEC inducida por la sobreexpresión de VEGF en gel de colágeno de tipo I**

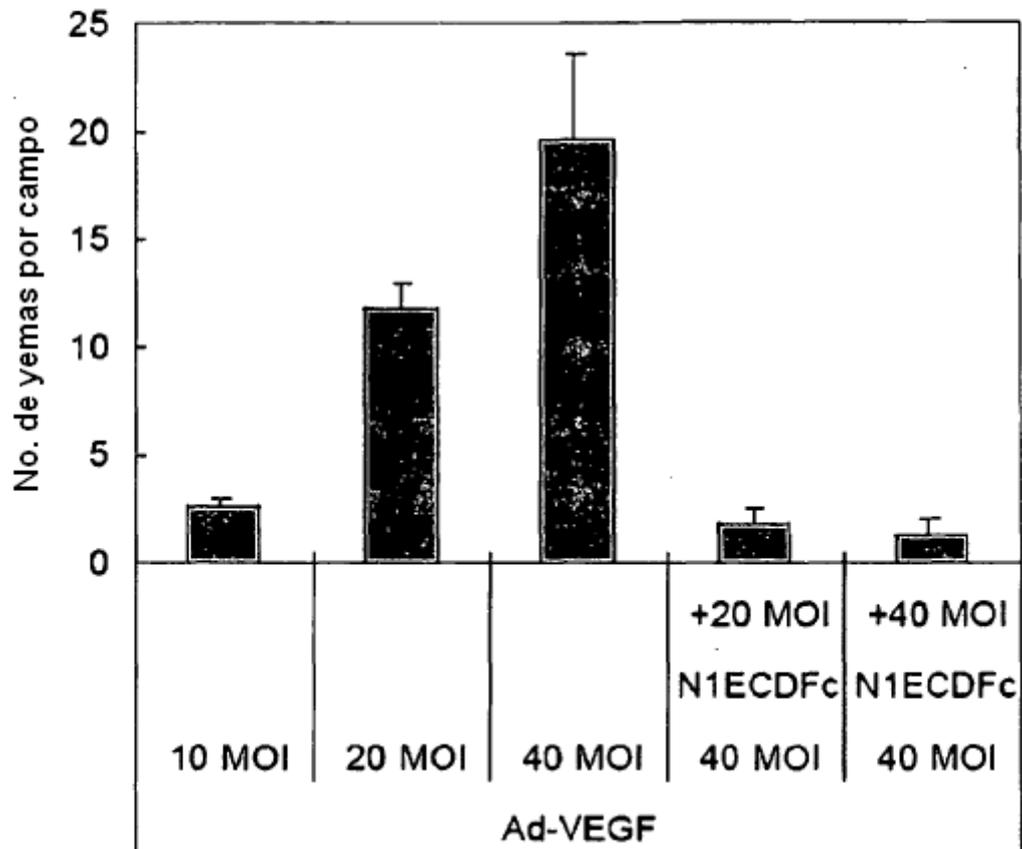


Figura 10

```

1  mprllapllc  ltlpalaar  glrcsqpsgt  clnggrceva  ngteacvcsq  afvgqrcqdp
61  spclstpckn  agtcyvvdhg  givdyacscp  lgfsgplclt  planaclanp  crnggtcdll
121 titeykcrp  pgwsgkscq  adpcasnpc  nggqclpfes  syicgcppgf  hgptcrqdv
181 ecsqnpqlr  hggtechneig  syrcacrath  tgphcelpyv  pcspspcng  gtrcptgdt
241 hecaciPgfa  gqnceenvdd  cpgnnckng  acvdgvntyn  crcppewtq  yctedvdec
301 lmpnacqna  tchnshggyn  cvcvngwtge  dcsdniddca  saacfqgat  hdrvasfyce
361 cphgrtgllc  hndacisnp  cnegsncdtn  pvngkaictc  prgytgpacs  qdvdecalga
421 npcehagkcl  ntlgsfecqc  lqgytgprce  idvnecisnp  cqndatcldq  igefqicmp
481 gyegvycein  tdecasspcl  hngrcvdkin  eflcqcpkgf  sghlcqydv  ecastpckng
541 akcldgpnty  tcvctegygt  thcevdidec  dpdpchiglc  kdgvatftcl  cpggytghhc
601 etninechs  pcrhggtcqd  rdnyylclcl  kgttgpncei  nlddcasnpc  dsgtcldkid
661 gycacepgy  tgsmcnvni  ecagspchn  gtcedgiagf  tcrcepyhd  ptclsevne
721 nsnpcihgac  rdglnykc  capgwsgtnc  dinncesn  pcvnggtck  mtsgyvctcr
781 egfsgpncqt  ninecasnpc  lnggtciddv  agykcncpl  ytgatcevl  apcatspck
841 sgvckesedy  esfscvcpt  wgggtceidi  necvkspcr  gascqntng  yrclcqagy
901 grncsdidd  crpnpcnng  sctdgvnaaf  cdclpgfqa  fceedineca  tnpccnganc
961 tdcvdsytct  cptgfngihc  enntpdctes  scfnggtcv  ginsftclcp  pgftgsycq
1021 dvnecdsr  lhggtcqdsy  gtykctcp  ytglncqnlv  rwcdsapck  ggkcwqtntq
1081 yhcecrsgwt  gfncdvlsv  cevaaqkrgi  dtllcqhg  lcvdeedkhy  chcqagyts
1141 ycedevdec  pnpccngat  tdylggfsc  cvagyhgnc  seeineclsq  pcqnggtcid
1201 ltntykcsc  rgtqgvhcei  nvddchppl  pasrspkfn  ngtevdqvg  ytctcppgfv
1261 gercegdvne  clsnpcdpr  tqncvqrnd  fhcecraght  grrcesving  crgkpcrng
1321 vavasntar  gficrcparf  egatcendar  tcgslrcng  gtcisgprsp  tclclgsftg
1381 pecqfpass  cvgsnpcyn  gtceptesp  fyrclcpak  ngllchily  sft 1433

```

SECUENCIA CONECTORA  
DLGPG

Figura 11

```

1  mpalrpaalr allwlwlcga gpahalqcrq gqepcvnegt cvtyhngtgy crcpegflge
61  ycqhrdpcek nrcqnggtcv tqamlgkate rcapgftged cqystshpcf vsrpcqnggt
121 chmlswdtye ctcqvgtgk qcqwtdivcls hpcengstcs svanqfscrc pagitgqked
181 adinecdipg rcqhggtcln lpgsyrcqcp qrftgqhcds pyvpcapspc vnggtcrqtg
241 dftsechclp gfegsncern iddcphkccq nggvcdgvn tyncrcppqw tgqfctedvd
301 ecllqpnacq nggtctnmg gygcvcvngw sgddcsenid dcafasctpg stcidrvasf
361 sclcpegkag llchlddaci snpchkgalc dtnplnggyi ctcpqaykga dtedvdeca
421 mansnpceha gkcvntdgaf hceclkgayag prcemdinec hsdpcqndat cldkiggftc
481 lcmpgfkgyh celevneqcs npcvmngqcv dkvnrfqclc ppgftgpvcq ididdcsstp
541 clngakcidh pngyecqcat gftgtlccden idncdpdpch hgqcqdgids ytcicnpgym
601 gaicsdqide cysspclndg rcidlvngyq cncqpgtsgl nceinfddca snpclhgacv
661 dginryscvc spgftgqrcn ididecasnp crkdatcind vngfrcmcpce gphhpscysq
721 vneclsspci hgnctgglsg ykclcdagw gincevdkne clsnpcqngg tcnnlvngyr
781 ctckkgfkgy ncqvnideca snpclnggtc lddvsgytch cmlpytgknc qtvlapcspn
841 pcenaavcke apnfesftcl capgwqgqrc tvdvdecvsk pcmngichn tggsymcecp
901 pgfsgmdcee dindclanpc qnggscvdkv ntfsclclpg fvgdkcqt dm neclsepckn
961 ggtcsdyvns ytctcpagfh gvhcennide ctesscfngg tcvdginsfs clcpvgftgp
1021 fclhdinecs snpclnsgtc vdgltgyrct cplgytgknc qtlvnlcsps pcknkgtaq
1081 ekarprclcp pgwdgaycdv lnvsckaaal qkgvpvehlc qhsgicinag nthhcqcp lg
1141 ytgsyceeql decasnpcqh gatcsdfigg yrcecvpgyq gvnceyevde cqnqpcqngg
1201 tcidlvnhfk cscppgtrgl lceeniddca gaphclnggq cvdriggysc rclpgfager
1261 cegdinecls npcsegsld ciqlknyqc vcrsaftgrh cetfldvcpg kpcclnggtca
1321 vasnvpdghi crcppgfsga rcqsscgvk crrgeqcvht asgphcfcpn hkdcesgcas
1381 npcqhggtcy pqrqppyysc rcsppfwgsh cesytaps 1419

```

SECUENCIA CONECTORA  
DLGPG

Figura 12

```

1  mglgargrrr  rrrlmalppp  pppmralpll  lllaglgaaa  ppcldgspca  nggrcthqgp
61  sleaacldcp  gwvgercqle  dpchsgpcag  rgvcqssvva  gtarfscrcl  rgfqgpdcsg
121 pdpcvsrpev  hgapcsvgpd  grfacacppg  yqqqscqsd  decrsgettcr  hggctclntpg
181 sfrcqcplgy  tgllcenpvv  pcapspcrng  gtrcqssdvt  ydcacldpgfe  gqncevnnvdd
241 cpghrcldng  tcvdgvntyn  cqcppewtgq  fctedvdecq  lqpnachngg  tcfnl1ggghs
301 cvcvngwtge  scsqnidcca  tavcfhgatc  hdrvasfyca  cpmgktgllc  hlddacvsnp
361 chedaicdtn  pvsgraietc  ppgftggacd  qdvdecsiga  npcehlgrcv  ntqgsflcqc
421 grgytgprce  tdvneclsgp  crnqatcldr  igqftcicma  gftgtycevd  idecqsspcv
481 nggvckdrvn  gfsctcpsgf  sgsmcqldvd  ecastpcrng  akcvdqpdgy  ecrcaegfeg
541 tlcernvddc  spdpchhgrc  vdgiassfca  capgytgirc  esqvdecrsq  pcrvggkclid
601 lvdkylcrep  pgttgvncev  niddcasnpc  tfgvcrdgin  rydcvcqpgf  tgplcnvein
661 ecasspcgeg  gscvdgengf  hclcppgslp  plclpanhpc  ahkpcshgvc  hdapggfrcv
721 cepgwsgrc  sqslapdace  sqpcqaggtc  tsdgigfrct  capgfqghqc  evlspctpsl
781 cehgghcesd  pdrltvcscp  pgwqgprcqq  dvdecagasp  cgphgtctnl  pgnfrcichr
841 gytgpfcdqd  iddcdpnpl  hggscqdgvg  sfscscldgf  agprcardvd  eclsspcggp
901 tctdhasft  cacppgyggf  hceidlpdca  psscfnggtc  vdgvsfscl  crpytgthc
961 qyeadpcfser  polhggicnp  thpgfector  egftgsqcqn  pvdwscqapc  qnggrcvqtg
1021 aycicppgws  grlcdiqslp  cteaaaqmgv  rleqlcqegg  kcidkgrshy  cvcpegtrtg
1081 hcehevdpt  aqpcqhggtc  rgymggyvce  cpagyagdsc  ednidecasq  pcqnggscid
1141 lvarylscsp  pgtlgvlcei  neddcldgps  ldsgvqclhn  gtcvdlvggf  rcncppgytg
1201 lhceadinec  rpgachaaht  rdclqdpqgh  frcvchpgft  gprcqialsp  cesqpcqhgg
1261 qcrhslgrgg  gltftchcvp  pfwglrcerv  arscrelqcp  vgipcqqtar  gprcacppgl
1321 sgpscrvsra  spsgatnasc  asapclhggs  clpvqsvpff  rcvcapggwg  prcetpsaa 1379

```

Secuencia Conectora  
 No secuencia conectora

Figura 13

```

1  mqpqllllll  lplnfpvilt  relcggspe  pcanggtclr  lsrgggicqc  apgflgetcq
61  fpdpcrdtql  cknggscqal  lptppssrsp  tspltphfsc  tcpsgftgdr  cqthleelcp
121 psfcsngghc  yvqasgrpqc  scepwtgeq  cqlrdfcsan  pcanggvcla  typqiqrccp
181 pgfeghtcer  dinecflepq  pcpqgtschn  tlgsyqclcp  vggqegpckl  rkgacppgsc
241 lnggtcqlvp  eghstfhlcl  cppgftglc  emnpddcvrh  qcqngatcld  gldtytclcp
301 ktwkgwdcse  dideceargp  prcrnggtcq  ntagsfhcvc  vsrgggagce  enlddcaaat
361 capgstcidr  vgsfscclcp  grtgllchle  dmclsqpcv  naqcstnplt  gstlcicqpg
421 ysgstchqdl  decqmaqgq  spcehgsci  ntpgsfncl  lpgytgsrce  adhneclsqp
481 chpgstcldl  latfhclcpp  glegrlceve  vnectsnpl  nqaachdlln  gfqclclpgf
541 tgarcekdm  ecsstpcang  grcrdqpgaf  yceclpgfeg  phcekevdec  lsdpcpvgas
601 cldlpgaffc  lcrpgftgql  cevplctpm  cqpqqcqqq  ehraplcpd  gspgcvpaed
661 ncpchhghc  rslcvdegw  tgpecetelg  gcistpcahg  gtchpqqsgy  nctcpagymg
721 ltcseevtac  hsgpclnggs  csirpegysc  tclpshtgrh  cqtavdhcvs  asclnggtcv
781 nkpgtffcl  atgfqglhce  ektnpscads  pcrnkacqd  tprgarclcs  ppytgsscqt
841 lidlcarkpc  phtarclqsg  psfqclclq  wtgalcdfpl  scqkaamsqg  ieisglcng
901 glcidtgssy  frcppgfgq  klcqdnvnc  epnpchgst  cvpqqsgyvc  qcappgyeqn
961 cskvldacqs  qpchnhtct  srpggfhcac  ppgfvglrce  gdvdecldrp  chpsgtaach
1021 slanafycqc  lpghtqrce  vemdlcqsq  csnggsceit  tgpppgftch  cpkgfegptc
1081 shkalscgh  hchnnglclp  spkpgspplc  acslgfggpd  cltppappgc  gppspclhng
1141 tctetpqlgn  pgfqctcppd  spgprcqrpg  1170

```

SECUENCIA CONECTORA  
DLGPG

Figura 14A

```

1 atgacaggct tccagggctg ccaggccctg ctgcatctgg ccaaggecgt ggttcgcttg
61 agatgctccc agccaagtgg gacctgcctg aatggaggga ggtgcaagt ggccaacggc
121 actgaagcct gtgtctgcag cggagcgttc gtgggcccagc gatgccagga ccccagccct
181 tgccctagca caccatgtaa gaatgctgga acgtgctatg ttgtggacca tggcggcatc
241 gtggactatg cctgcagtgg cccctggggt ttctctgggc ccctctgcct gacacctctg
301 gccaatgcct gcctggccaa cccctgccgc aacgggggga cctgtgacct gctcactctc
361 acagaataca agtgccggtg cccgccaggg tggtcaggaa agtcatgtca gcaagccgac
421 ccctgtgcct ccaaccctg tgecaatggt ggccagtgcc tgcccttga gtctcatac
481 atctgtggct gcccgcccgg ctcccatggc cccacctgca gacaagatgt taacgagtgc
541 agccagaacc ctgggttgtg ccgtcatggc ggcacgtgcc acaatgagat tggctcctat
601 cgctgtgcct gccgtgccac ccacactggt cccactgcg agctgcccta cgtgccctgc
661 agcccctcac cctgccagaa cggaggcacc tgccgccta cgggggacac caccacagag
721 tgtgectgcc tgccaggctt tgctggacag aactgtgaag aaaatgtgga tgactgcca
781 ggaaacaact gcaagaacgg ggggtgcctgt gtggacggtg tgaataccta caattgccgc
841 tgcccaccgg agtggacagg tcagtactgc acagaggatg tggacgagtg tcagctcatg
901 cccaacgcct gccagaatgg cggaaacctgc cacaactccc acgggtggcta caactgcgtg
961 tgtgtcaatg gctggactgg tgaggactgc agtgagaaca ttgatgactg tgccagtgcc
1021 gcctgttttc aggggtgccac ctgccatgac cgtgtggctt ccttctactg cgagtgtcca
1081 catgggcgca caggcctgct gtgccacctg aacgatgcgt gtatcagcaa ccctgcaac
1141 gagggctcca actgcgacac caacctgtc aacggcaagg ccactctgac ttgccctcg
1201 gggtagaccg ggcagcctg cagccaggac tgggatgagt gcctctagg tgccaaccg
1261 tgtgagcagc ggggcaagt cctcaacaca ctgggctct tcgagtgtca gtgtctacag
1321 ggctacactg ggccccgctg tgagattgat gtcaacgagt gcatctcaa ccatgtcag
1381 aatgatgcca cgtgcctgga ccagattggg gatttcagt gtatatgtat gccaggttat
1441 gaggggtgat actgtgagat caacacggac gactgtgcca gcagcccctg tctacacaat
1501 ggcgctgctg tggacaagat caacgagttc ctgtgtcagt gtcccaaagg cttcagcggg
1561 cacctgtgcc agtatgacgt ggatgagtgcc gccagcacac catgcaagaa cggcgccaag
1621 tgccctggatg ggcccaacac ctacacctgc gtgtgcacag aaggttacac ggggaccac
1681 tgcgaggtgg acattgacga gtgtgacct gacctgtc actatggttt gtgcaaggat
1741 ggtgtggcca cctttacctg cctctgccag ccaggctaca caggccatca ctgtgagacc
1801 aacatlaatg agtgtcacag ccagccgtgc cgccatggcg gcacctgcca ggacctgac
1861 aactactacc tctgcttatg cctcaagggg accacaggac ccaactgtga gatcaatctg
1921 gatgactgtg cgagcaacc cctgtgactct ggcacgtgtc tggacaagat cgatggctac
1981 gactgtgctg gcgagccagg ctacacaggg agcatgtgta atgtcaacat tgacgaatgt
2041 gcgggcagcc cctgccaaa cgggggcacc tgtgaggatg gcatcgccgg cttcacttgc
2101 cgctgccccg agggctacca cgacctacg tgccctgtct aggtcaacga gtgcaacagt
2161 aaccctgca tccatggagc ttgcccggat ggcccaatg gatacaaatg tgactgtgcc
2221 cctgggtgga gtgggacaaa ctgtgacatc aacaacaatg agtgtgagtc caaccctgt
2281 gtcaacggtg gcacctgcaa agacatgacc agtggctacg tatgcaectg ccgagaaggc
2341 ttcagtggcc ctaactgcca gaccaacatt aacgaatgtg cttccaacc cgtcctgaac
2401 cagggcacct gcattgatga tctogctggg tacaatgca actgccctct gccctataca
2461 ggagccacat gtgagtggt gttggcccca tgtgccacca gccctgcaa aaacagtggg
2521 gtatgcaagg agtctgagga ctatgagagc tttcctgtg tctgtcccac aggtggcaa
2581 ggtcaaacct gcgagatcga catcaatgag tgtgtgaaa gccctgtctg ccatgggtgc
2641 tcttgccaga acaccaatgg cagctaccgc tgccctctgc aggtggtcta cacgggtcgc
2701 aactgcgaga gtgacatcga tgactgccga cccaaccat gtcacaacgg gggttcctgc
2761 actgacgggg tcaacgcggc cttctgcgac tgccctgccg gcttcagggg tgccctctgt
2821 gaggaggaca tcaacgaatg cgcagcaat ccatgcaaaa atggcgcaa ctgcactgac
2881 tgcgtggaca gctacacgtg cacctgcccc acgggcttca atggcatcca ttgcgagaac
2941 aacacacctg actglaccga gagctcctgt tccaatgggt gcacctgtgt ggtggtatc
3001 aactccttca cctgtctgtg cccacctggc ttcaagggca gctactgcca gtatgacgtc
3061 aatgagtggt actcacggcc ctgtctgcat ggtggcacc gccaagacag ctatgggtacc
3121 tataagtgt cctgccaca gggctaacct ggtctcaact gccagaacct tgtgcgctgg
3181 tgtgactcag ctccctgcaa gaatggggc aagtgtctggc agaccaacac acagtaccac
3241 tgcgagtgcc gcagcggctg gactggcttc aactgcgacg tgctcagttg tctcgcgag

```

Figura 14B

```

3301 gtggctgcac agaagcgagg catcgatgtc actctcctat gccagcacgg agggctctgt
3361 gtggatgagg aagacaagca ttactgccac tgccaggcag gatacacggg cagctactgt
3421 gaggacgagg tggacgagtg ctcacctaata cctgccaga acggagccac ctgcactgac
3481 tatctcgggtg gcttttctctg caagtgtgtg gctgggtacc atggctctaa ctgctctgag
3541 gagatcaacg agtgcctatc ccaaccctgc cagaatgggg gtacctgcat tgatctgacc
3601 aacacctaca agtgctcctg ccccaggggc acacaggggtg tacactgtga gatcaacgtc
3661 gatgactgcc atctcccct agaccctgct tcccgaagcc ccaaagtctt caataatggc
3721 acctgcgtgg accagggtggg tggctataacc tgcacctgcc cgccaggctt cgtcggggag
3781 cgggtgcgagg gcgatgtcaa tgagtgtctc tccaaccct gtgaccacag tggcaccag
3841 aactgcgtgc agcgtgttaa tgacttccac tgcgagtgcc gggctggcca cactggacgc
3901 cgctgtgagt cggtcattaa tggctgcagg ggcaaaccat gcaggaatgg aggtgtctgt
3961 gctgtggcct ccaacaccgc ccgtggattc atctgtaggt gccctgcggg ctctcagggt
4021 gccacttggtg aaaatgacgc ccgcacttgt ggcagtttgc gctgectcaa cgggtggtacg
4081 tgcatctcag gccacgcag tcccacctgc ctatgcctgg gctectcac tggccctgaa
4141 tgccagttcc cagccagcag ccctgtgtg ggtagcaacc cctgctaaa tcagggcacc
4201 tgtgagcca catccgagag cccttctac cgctgtctat gccctgcaa attcaacggg
4261 ctgctgtgcc acatcctgga ctacagcttc aca 4293

```

Figura 15A

511 atgcccgcctc tgcgtcccgc cgcgctgccc  
 541 gcgctgctgt ggctctggct gtgcggcgcg ggccegcgcg acgctttgca gtgtcgaggt  
 601 ggtcaagagc cctgtgtaaa tgaggggacc tgtgttacct accacaacgg cacaggctac  
 661 tgcgatgtc cagagggctt cttgggagaa tattgtcaac atcgagacce ttgtgagaag  
 721 aaccgctgtc agaatggtgg tacttgtgtg acgcaggcca tgttgggaaa agccacctgt  
 781 cgatgtgctc cagggttcac aggggaggac tgccaatact cgacctctca ccctgtttt  
 841 gtttcccgcg cctgtcagaa tggaggtacc tgccacatgc tcagctggga cacctatgag  
 901 tgcacctgtc aagtggctt cacaggaag cagtgtcagt ggacagatgt ctgtctgtct  
 961 catccctgtg aaaatggaag cacctgtagc tctgtggcca accagttctc ctgcagatgt  
 1021 cctgcaggca tcacaggcca gaagtgtgac gccgacatca atgaatgtga cattccagga  
 1081 cgctgccaac atggtggcac ctgcctcaac ctctctgggt cctaccgatg ccaatgccct  
 1141 cagcggttca caggccagca ctgtgacagc ccttacgtgc cctgtgcacc ctaccctgc  
 1201 gtcaatggag gcacctgccc tcagactgga gacttcactt ctgaatgcca ttgcctgcca  
 1261 ggctttgaag ggagcaactg cgagcggaat atcgacgact gccctaacca caagtgtcag  
 1321 aatggagggg tgtgtgtgga tggcgtcaat acttacaact gccgctgccc cctcagtgg  
 1381 actgggcagt tctgcacaga agactgggat gagtgtctgc tgcagcccaa tgcctgtcag  
 1441 aatggaggca cttgcaccaa ccgcaacgga ggctacggct gcgtgtgctg gaacggctgg  
 1501 agtggggatg actgcagcga gaacatcgat gactgtgcct tcgcttctctg cacgccagge  
 1561 tccacctgta ttgaccgtgt ggcctccttc tectgccttt gtccagaggg aaaggcaggg  
 1621 ctctgtgtc atctggatga tgcctgtatc agcaaccctt gtcacaaggg ggcgctgtgt  
 1681 gataccaacc ccctgaatgg gcagtacatt tgcacctgcc cacaggcgta caagggcgct  
 1741 gactgcacag aagacgtgga tgagtgtgct atggccaaca gtaacccttg tgagcatgca  
 1801 ggaaagtgtg tgaatacaga tggcgcttct cactgcgagt gtctgaaggg ctacgcaggg  
 1861 cctcgctgtg agatggacat caacgagtgt cactcagacc cctgtcagaa cgacgccacc  
 1921 tgctggata agatggagg ctctcactgt ctctgcctgc cgggtttcaa aggtgtgcat  
 1981 tgtgaactgg aggtgaatga atgcagagc aaccctgtgtg taaacaatgg cagtgtgtg  
 2041 gacaaagtca atcgcttcca gtgtctgtgt cccctggtt tcacaggacc agtvtgccag  
 2101 atcgacattg acgactgtc cagtaactcc tgcctgaatg gggccaagtg catcgatcac  
 2161 ccgaatggct atgaatgcca gtgtgccaca ggattcactg gcacactgtg tgatgagaac  
 2221 atcgacaact gtgacccgga tecttgccac catggccagt gccaggatgg gattgactcc  
 2281 tacacctgca tctgcaacc cgggtacatg ggagccatct gtagtacca gattgatgaa  
 2341 tgctacagca gccctgctt gaatgatgga cgtgtcatcg acctggtgaa cggctaccag  
 2401 tgcaactgcc aaccgggtac ctccagcctt aattgtgaaa ttaatttga tgactgtgcc  
 2461 agcaaccctt gtctgcacgg agcctgtgtg gacggcatca accgttacag ttgtgtgtgc  
 2521 tctccgggat tcacagggca gaggtgcaac atagacattg atgagtgtgc ctccaacccc  
 2581 tgtcgcaagg atgcgacgtg catcaatgac gtgaatggtt tccgggtgat gtgccctgag  
 2641 ggaccacacc atcccagctg ctactcacag gtgaacgagt gtttgagcag tcctgtcatc  
 2701 catgaaaact gtactggagg tctcagtggc tataagtgcc tctgcgatgc aggtgggtt  
 2761 ggtacaact gcgaagtgga caaaaatgag tgtctttcta acccgtgcca gaatggaggg  
 2821 acatgtaata acctggtgaa tggctacagg tgtacatgca agaaggggtt caaaggctat  
 2881 aactgccagg tgaacataga tgagtgtgcc tcgaaccctg gtctgaacca agggacctgc  
 2941 ctcgatgacg tcagtggcta cacctgccac tgcattgctgc ctacacaggg caagaattgt  
 3001 caaacgggtg tggcgccctg ctcccctaac ccgtgtgaga acgctgcagt ttgtaaagag  
 3061 gcaaccaact ttgagagctt cacctgctct tgtgcccctg gctggcaagg tcagcgtgt  
 3121 acagttgacg ttgatgagtg tgtctccaag ccgtgtatga acaatggcat ctgccataat  
 3181 actcagggca gctacatgtg cgagtgcctt cccggcttca gtggatgga ctgtgaggag  
 3241 gacatcaatg actgccttgc caaccctgca cagaacggag gctcctgtgt ggacaaagtg  
 3301 aacaccttct cctgcctgtg ccttctctggc ttcgtagggg acaagtgcca aacagacatg  
 3361 aatgaatgtc tgagcgagcc ctgtaagaat ggggggacct gctctgacta cgtcaacagc  
 3421 tacacctgca cgtgccctgc gggcttccat ggagtccaet gtgaaaacaa catcgatgag  
 3481 tgcactgaga gctcctgttt caatggcggc acgtgtgttg atgggatcaa ctcttctct  
 3541 tgccttatgcc ctgtgggtt cactggctcc tctgtcctcc atgatataa tgagtgcagc  
 3601 tctaaccctg gctgaattc ggaacagtgt gttgatggc tgggtacctc cagcaccacc  
 3661 tgtcccttgg gctacactgg gaaaaactgt cagaccctgg tgaacctctg cagccctct  
 3721 ccatgtaaaa acaaaggaa c ttgtgtcag gaaaaggcaa ggccacgctg cctgtgtccg  
 3781 cctggatggg atggcgcata ctgtgatgtg ctcaatgtgt cctgtaaggg ggcagccttg

## Figura 15B

```

3841 cagaaaggag tacctggtga acacttgtgc cagcactcgg gtatctgtat caatgctggc
3901 aacacgcata actgccagtg cccctgggc tacacgggga gctactgcca ggaacagctt
3961 gacgagtgtg cgtccaatcc atgccagcat ggtgccacct gcagtgactt catcggagga
4021 tacagatgtg agtgtgttcc agggatcag ggtgtcaact gtgagtatga agtggacgag
4081 tgccagaacc agccctgtca gaacggaggc acctgcatcg acctcgtgaa ccatttcaag
4141 tgctcgtgcc caccaggcac cgggggctg ctttgtgaag agaacattga tgactgtgct
4201 ggggcccccc actgccttaa tgggtggccag tgtgtggacc ggattggagg ctacagttgt
4261 cgctgtttgc ctggctttgc tggggagcgg tgtgaggggg acatcaatga atgcctgtcc
4321 aatccttgca gtcagagggg cagcctggac tgcattcagc tcaaaaataa ctaccagtgt
4381 gtctgccgca gcgccttcac aggccgacac tgcgaaacct tcctagatgt gtgtccccag
4441 aagccttgcc tgaatggagg gacttgtgct gtggctagca acgtgcctga tggcttcatt
4501 tgcggttgtc ccccaggggt ctccggggca agatgccaga gcagctgtgg acaagtgaag
4561 tgcagaagag gggagcagtg tgtgcacacc gcctcgggac cccactgctt ctgcccgaac
4621 cacaaggact gcgagtcagg ttgcgctagt aaccctgcc agcacggagg cacctgctac
4681 cctcagcgcc agcctcetta ctactcttgc cgctgctccc caccgttctg gggcagccac
4741 tgcgagagct acacagcccc caccagc 4767

```

Figura 16A

|      |             |             |             |             |             |             |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 60   |             |             |             |             |             | a           |
| 61   | tggggetggg  | ggcccggggc  | cgccgcgcgc  | gtcgtcgcct  | gatggccttg  | ccaccgccac  |
| 121  | caccgcccac  | gggggcgctg  | cccctgctgc  | tgetgctagc  | ggggctgggg  | gctgcagcac  |
| 181  | ccccttgtct  | ggatggaagc  | ccatgtgcaa  | atggaggtcg  | gtgcaccac   | cagcagccct  |
| 241  | ccctggagge  | tgcttgcctg  | tgctgcccag  | gctgggtggg  | tgagcgggtc  | cagctggaag  |
| 301  | acccttgcca  | ctcaggccct  | tgtgctggcc  | gaggcgtttg  | ccagagtcca  | gtggtggcgg  |
| 361  | gcaccgcccg  | attctcctgt  | cgttgtctcc  | gtggctcca   | aggcccagac  | tgctcccagc  |
| 421  | cagacccttg  | cgtcagcagg  | ccctgtgttc  | atggtgcccc  | ctgctcagtg  | gggcccgatg  |
| 481  | gccgatttgc  | ctgtgcctgc  | ccacctggct  | accagggcca  | aagctgccc   | agtgcacatg  |
| 541  | atgagtgcgg  | atctggtaca  | acttgccgtc  | atggtggtac  | ctgtctcaat  | acacctggat  |
| 601  | ccttccgctg  | ccagtgtcct  | cttggttata  | cagggctgct  | gtgtgagaac  | cccgtagtgc  |
| 661  | cctgtgcccc  | ttccccgtgt  | cgtaatgggtg | gcacctgtag  | gcagagcagt  | gatgtcacat  |
| 721  | atgactgtgc  | ttgccttcc   | ggcttcgagg  | gccagaactg  | tgaagtcaac  | gtggatgact  |
| 781  | gtcctggaca  | tcgggtgtct  | aatgggggaa  | cgtgtgtaga  | cggtgtcaat  | acttacaact  |
| 841  | gccagtggccc | tcgggagtgg  | acaggccagt  | tctgtacaga  | agatgtggat  | gagtgtcagc  |
| 901  | tgcagcccaa  | tgccctgccac | aatgggggta  | cctgcttcaa  | cctaactgggt | ggccacagct  |
| 961  | gtgtatgtgt  | caatggctgg  | acgggtgaga  | gctgcagtca  | gaatatcgat  | gactgtgcta  |
| 1021 | cagccgtgtg  | tttccatggg  | gccacctgcc  | atgaccgtgt  | ggcctctttc  | tactgtgect  |
| 1081 | gccctatggg  | gaagacaggc  | ctcttgtgtc  | atctggatga  | tgcatgtgtc  | agcaaccctc  |
| 1141 | gccatgagga  | tgctatctgt  | gacacaaacc  | ctgtgagtgg  | ccgggccatc  | tgcaacctgc  |
| 1201 | cacctggcct  | caactggagg  | gcatgtgacc  | aggatgtgga  | tgagtgtctg  | attggtgcca  |
| 1261 | accctgtgca  | acatttgggt  | cggtgtgtga  | atacacaggg  | ctcattcttg  | tgccaatgtg  |
| 1321 | gccgtggcta  | tactggacct  | cgctgtgaga  | ctgatgtcaa  | tgagtgtctc  | tcggggccct  |
| 1381 | gccgcaacca  | ggccacgtgt  | cttgaccgaa  | ttggccagtt  | tacttgcata  | tgcatggcag  |
| 1441 | gcttcacagg  | gacctactgt  | gaggtggaca  | tcgacgaatg  | tcagagcagc  | ccatgtgtca  |
| 1501 | atggtgggtg  | ctgcaaggac  | agagtcaatg  | gcttcagctg  | cacctgccc   | tcaggattca  |
| 1561 | gtgggtccat  | gtgtcagctg  | gatgtggatg  | agtgtgcaag  | cactccctgc  | cggaatgggtg |
| 1621 | ccaatgtgtg  | ggaccagcct  | gacggctatg  | agtgtcgtg   | tgcaaggggc  | tttgagggca  |
| 1681 | ctttgtgtga  | gcaaaacgtg  | gatgactgct  | ctccggatcc  | ctgccaccac  | gggcgctgtg  |
| 1741 | tcgatggcat  | tgctagcttc  | tcgtgtgctt  | gtgccccagg  | ctatacgggc  | atacgtgtg   |
| 1801 | agagccaggt  | ggatgagtgc  | cgagccagc   | cctgtcgata  | tgggggcaaa  | tgtctagact  |
| 1861 | tggtggacaa  | gtacctctgc  | cgttgtcctc  | ccggaaccac  | aggtgtgaac  | tgtgaagtca  |
| 1921 | acattgatga  | ctgtgccagt  | aaccctgta   | cctttggagt  | ttgccgtgat  | ggcatcaacc  |
| 1981 | gttatgactg  | tgtctgtcag  | cctggattca  | cagggccctc  | ctgcaacgtg  | gagatcaatg  |
| 2041 | agtgtgcatc  | cagcccattg  | ggagaggggtg | gctcctgtgt  | ggatggggaa  | aatggcttcc  |
| 2101 | actgctctg   | tcacctggc   | tcctgctc    | cactttgctc  | acctgcgaac  | catccctgtg  |
| 2161 | cccacaagcc  | ctgtagtcat  | ggagtctgcc  | atgatgcacc  | aggcgggttc  | cgctgtgttt  |
| 2221 | gtgagcccgg  | gtggagtggc  | cctcgctgta  | gccagagcct  | ggctccagat  | gcctgtgagt  |
| 2281 | cccagccctg  | ccaggctggt  | ggcacctgca  | ccagtgatgg  | aataggcttt  | cgctgcacct  |
| 2341 | gtgcccctgg  | attccagggc  | catcagtgtg  | aggtgctgtc  | cccctgtact  | ccaagcctct  |
| 2401 | gtgagcacgg  | aggccactgt  | gagtctgacc  | ctgaccggct  | gactgtctgt  | tctgtcccc   |
| 2461 | caggctggca  | aggcccacga  | tgccagcagg  | atgtggatga  | atgtgccggt  | gctcaccct   |
| 2521 | gcggccccca  | tggtacctgc  | accaacctgc  | cagggaaatt  | caggtgcatc  | tgccacaggg  |
| 2581 | gatacactgg  | ccccttctgt  | gatcaagaca  | ttgacgactg  | tgaccccaac  | ccgtgcctcc  |
| 2641 | atggtggctc  | ctgccaggat  | ggcgtgggct  | ccttttctctg | ttcttgcctc  | gacggctttg  |
| 2701 | ctggtcctcg  | ctgtgcccga  | gatgtggacg  | aatgtctgag  | cagcccctgt  | ggccctggca  |
| 2761 | cctgtactga  | tcacgtggcc  | tcttcaacct  | gtgctgtccc  | acctggttat  | ggaggcttcc  |
| 2821 | actgtgagat  | tgaactgccc  | gactgcagcc  | ccagtctctg  | cttcaatgga  | gggacctgtg  |
| 2881 | tggatggcgt  | gagctccttc  | agctgtctgt  | gtcggcccg   | ctacacaggc  | acacactgcc  |
| 2941 | aatacagggc  | tgaccctctg  | ttttcccggc  | cctgtctgca  | cgggggcatc  | tgcaaccca   |
| 3001 | cccaccaggg  | atgtgaatgc  | acctgcccgg  | agggcttca   | tgggagttag  | tgtcagaacc  |
| 3061 | cagtggactg  | gtgcagccag  | gcacctgtc   | agaatggggg  | tcgctgtgtc  | cagactgggg  |
| 3121 | cttactgeat  | ttgtccacct  | ggatggagtg  | gccgctgtg   | cgacatacaa  | agcctgcct   |
| 3181 | gcacggaggc  | cgagcccag   | atgggggtga  | ggttggagca  | gctgtgtcag  | gaaggtggaa  |
| 3241 | agtgcataga  | caagggccgc  | tcccactact  | gtgtgtgtcc  | agagggccgt  | acgggtagtcc |
| 3301 | actgtgaaca  | cgaggtggat  | cctgcaagg   | cccagccttg  | ccagcacggg  | ggcaacttgc  |

## Figura 16B

```

3361 gtggttacat ggggggctat gtgtgtgagt gtccagctgg ctatgctggt gacagttgtg
3421 aggataatat agatgagtgt gcttcccagc cctgccagaa cggaggctcc tgtatcgatc
3481 ttgtggcccc ctatctctgt tctgtcccc ctggcacact gggagttctc tgtgagatca
3541 atgaggacga ctgtgaccta ggcccacctc tggactcagg cgttcagtgc ctacacaatg
3601 gcacctgtgt ggacctggtg ggtggcttcc gctgtaactg tccccagga tacacaggtc
3661 tgcactgtga ggcagacatc aatgagtgtc gcccggtgc ctgccatgca gcgcatactc
3721 gggactgcct acaagatcca ggtgggcatt tccgctgctg ctgccatcct ggcttcacag
3781 ggctctgctg tcagattgct ctgtccccct gtgagtccca gccatgtcag catggaggcc
3841 agtgccgtca cagcctagge cgtggaggtg ggctgacctt cacctgtcac tgtgtcccgc
3901 cattctgggg tctgcttgtg gagegggtgg cacgctcttg ccgagagctg cagtgccag
3961 tgggtatccc atgccagcag acagcccgtg gaccacgctg cgcttgtcct ccggggctgt
4021 ccgggccctc ctgccgggtt tctagggcgt caccctcagg agctactaac gccagctgcg
4081 cctctgcccc ttgtctgcat gggggctcat gcctacctgt acagagtgtc ctttcttcc
4141 gctgtgtgtg cgctccgggc tggggcggec cgcgttgtga gacccttcc gcagcc 4196

```

Figura 17A

```

117
121 agccccagtt gctgctgctg ctgctcttgc cactcaattt cctgtcctc atgaccagag
181 agcttctgtg tggaggatcc ccagagccct gtgccaacgg aggcacctgc ctgaggctat
241 ctgagggaca agggatctgc cagtgtgccc ctggatttct gggtgagact tgccagtttc
301 ctgacctctg cagggatacc caactctgca agaatgggtg cagctgcca gacctgctcc
361 ccacaccccc aagctcccggt agtccactt cteactgac cctcacttc tctgcacct
421 gcccctctgg cttcacccgt gatcgatgcc aaacctatct ggaagagctc tgtccacctt
481 ctttctgttc caacgggggt cactgctatg ttcaggcctc aggcgceca cagtgetcct
541 gcgagcctgg gtggacaggt gagcaatgcc agctccgaga cttctgctca gccaacccct
601 gtgccaacgg aggcgtgtgc ctggccacat acccccagat ccagtgcgc tgtccacctg
661 ggttcgaggg tcacacctgt gaacgcgaca tcaacgagtg cttcctggag ccgggacctt
721 gccctcaggg cacctcctgc cataacacct tgggttcta ccagtgtctc tgccctgtgg
781 ggcaggaagg tccccagtg aagctcagga agggagcctg cctcctgga agctgtctca
841 atgggggac ctgccagctg gtcccagagg gacctccac cttcactctc tgctctgtc
901 ccccaggttt cacggggctg gactgtgaga tgaaccaga tgactgtgtc aggcaccagt
961 gtcagaacgg ggccacctgt ctggatgggc tggataccta cacctgctc tgcccaaga
1021 catggaaggg ctgggactgc tctgaagata tagatgaatg tgaagccgg ggtcccctc
1081 gctgcaggaa cgggtggcacc tgccagaaca cagctggcag cttcactgt gtgtcgtga
1141 tggctgggg cggtgcaggt tgtgaggaga acctggatga ctgtgcagct gccacctgtg
1201 cccgggata cacctgcate gacctgtgg gettttctc ctgectctgc ccacctggac
1261 gcacaggcct cctgtgccac ctggaagaca tgtgtttgag tcagccgtgc cacgtgaatg
1321 ccagtgcag caccaacct ctgacaggct ccacctctg catatgccag cctggctact
1381 caggatccac ctgtcaccaa gatctggatg agtgccaaat ggcccagcaa ggacctcctc
1441 cctgcgaa ca tggcgctcc tgcataca ca cccctgctc cttcaactgc ctctgctgc
1501 ctggttacac gggctcccgc tgtgaagctg accacaatga gtgctgtca cagccctgcc
1561 acccaggcag cacctgctg gacctgctt caacctcca ctgctctgc ccaccaggct
1621 tggaaagggag gctctgtgag gtggaggtea atgagtgcac ctctaacc tgctgaacc
1681 aagctgcctg ccatgacctg ctcaacggct tccagtgcct ctgecttct ggatcaccg
1741 gcgcccgatg tgagaaagac atggaagagt gtagcagcac cccctgtgcc aatggggggc
1801 gctgccgaga ccagcctgga gcttctact gcgagtgtct cccaggttt gaagggccac
1861 actgtgagaa agaagtggac gaatgtctga gtgacctg cccctgtgga gccagctgcc
1921 ttgatctccc cggagcattc ttctgctct gccgtcctg tttcacaggt caactttgtg
1981 aggttccctt gtgaccccc aacatgtgcc aacctggaca gcaatgcaa ggtcaggaac
2041 acagagcccc ctgectctgc cctgacggaa gtccctggctg tgttctgcc gaggacaact
2101 gcccctgtca ccatggccat tgccagagat ccttgtgtgt gtgtgatgag ggctggactg
2161 gaccagaatg cgagacagaa ctgggtggct gcactccac acctgtgcc catgggggga
2221 cctgccaccc acagccgtct ggctacaact gtacctgccc tgcaggctac atggggtga
2281 cctgtagtga ggaggtgaca gcttgcact cagggcctg tctcaatggt ggctctgca
2341 gcatccgtcc tgagggetat tctgcaact gcttccaag tcacacaggt cgcaactgcc
2401 agactgccgt ggacctgt gtgtctgct cgtgctcaa tgggggtacc tgtgtgaaca
2461 agcctggcac tttctctgc ctctgtgcca ctggctcca ggggtgca tgtgaggaga
2521 agactaacc cagctgtgca gacagccct gcaggaaca ggcaacctgc caagacacac
2581 ctgagggggc ccgctgctc tgcagccct gctatacagg aagcagctgc cagactctga
2641 tagacttgtg tgcccgaag cctgtccac aactgctc atgctccag agtgggacct
2701 cgttccagt cctgtgctc cagggatgga cagggctct ctgtgactc cactgtctt
2761 gccagatggc cgcaatgag caaggcatag agatctctg cctgtgccag aatggaggcc
2821 tctgtattga cacgggctc tctatttct gccgtgccc tctggattc caaggcaagt
2881 tatgccagga taatatgaac cctgagagc ccaatcctg ccatcagg tctacctgtg
2941 tgctcagcc cagtggctat gtctgccagt gtgcccagg ctatgaggga cagaactgct
3001 caaaagtact tgaagctgt cagtcccagc cctgccaca ccacggaacc tgtacctcca
3061 ggcctggagg cttccactgt gcctgccctc caggctcgt gggactgctc tgtgaggag
3121 atgtggatga gtgtctggac cggccctgt acccctcgg cactgcagct tgccactctt
3181 tagccaacgc cttctactgc cagtgtctgc ctgggcacac aggcagcgg tgtgagggtg
3241 agatggacct ctgtcagag caacctgct ccaatggagg atcctgtgag atcacaacag
3301 ggccaccccc tggcttacc tgtcactgcc ccaaggttt tgaagggccc acctgcagcc

```

Figura 17B

```
3361 acaaagccct ttctgoggc atccatcact gccacaatgg aggcctatgt ctgcctccc
3421 ctaagccagg gtcaccacca ctctgtgctt gctcagtggt ttttgggggc cctgactgtc
3481 tgacacctcc agctccaccg ggtgoggtc cccctcacc ctgcctgcac aatggtacct
3541 gcactgagac cctgggttg ggcaaccgg gctttcaatg cacctgcct cctgactctc
3601 cagggccccg gtgtcaaagg ccaggg 3626
```

Secuencia Conectora

```
GAT CTG GGC CCG GGC
D L G P G
```

Figura 18A

```

1 atgccgcgcg tectggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcccgcgct cgccgcacga
61 ggcccgcgat gctcccagcc cggtgagacc tgccctgaat gcgggaaagt tgaageggcc
121 aatggcacgg aggcctgctg ctgtggcggg gccttcgtgg gcccgcgatg ccaggacccc
181 aaccctgtcc tcagcacccc ctgcaagaac gccgggacat gccacgtggt ggaccgcaga
241 ggcgtggcag actatgcctg cagctgtgcc ctgggcttet ctgggcccc ctgctgaca
301 cccctggaca atgcctgcct caccaacccc tgccgcaacg ggggcaactg cgacctgctc
361 acgtgacgg agtacaagtg ccgctgcccg cccggctggt cagggaatc gtgccagcag
421 gctgacccgt ggcctccaa cccctgcgcc aacgggtggc agtgctgcc cttcgaggcc
481 tcctacatct gccactgccc acccagcttc catggcccc cctgcccga ggatgtcaac
541 gagtgtggcc agaagcccgg gctttggcg cacggaggca cctgccaaa cgaggtcggc
601 tcctaccgct gctgtgccc cgcacccac actggcccc actgcgagcg gccctacgtg
661 ccctgcagcc cctgcacctg ccagaacggg ggcacctgcc gccccacggg cgacgtcacc
721 cacgagtgtg cctgcctgcc aggttcacc ggccagaact gtgaggaaaa tatcgacgat
781 tgtccaggaa acaactgcaa gaacgggggt gcctgtgtgg acggcgtgaa cacctacaac
841 tgccgctgcc cgccagagtg gacaggtcag tactgtaccg aggatgtgga cgagtgccag
901 ctgatgcaa atgcctgcca gaacggcggg acctgccaca acaccacggg tggctacaac
961 tgctgtgtg tcaacggctg gactgggtgag gactgcagcg agaacattga tgactgtgcc
1021 agcgcgcct gcttccacgg cgcacactgc catgaccgtg tggcctcct ctactgcgag
1081 tgtcccatg gccgcacagg tctgtgtg cactcaacg acgatgat cagcaacccc
1141 tgtaacgagg gctccaactg cgacaccaac cctgtcaatg gcaaggccat ctgcaactgc
1201 ccctcgggtg acacggggcc ggctgcagc caggacgtgg atgagtctc gctgggtgcc
1261 aaccctgctg agcatgctgg caagtgcate aacacgtgg gctcctcga gtgccagtgt
1321 ctgcagggct acacggggcc ccgatgcgag atcgacgtca acgagtgcgt ctgcaaccg
1381 tgccagaacg acgccacctg cctggaccag attggggagt tccagtgcac ctgcatgcc
1441 ggctacgagg gtgtgcactg ctaggtcaac acagacgagt gtgccagcag cccctgectg
1501 cacaatggcc gctgcctgga caagatcaat gaggctccagt gcgagtgcc cacgggcttc
1561 actgggcatc tgtgccagta cgatgtggac gagtgtgcca gcaacccctg caagaatggt
1621 gccaaagtcc tggacggacc caacacttac acctgtgtgt gcaaggagg gtacacgggg
1681 acgactgctg aggtggacat cgatgagtgc gaccccgacc cctgccaacta cggctcctgc
1741 aaggacggcg tcgccacctt cacctgcctc tgccgccag gctacacggg ccaccactgc
1801 gagaccaaca tcaacgagtg ctccagccag cctgcccgc acgggggac ctgccaggac
1861 cgcgacaacg cctacctctg ctctgcctg aaggggacca caggaccaa ctgcgagatc
1921 aacctggatg actgtgccag cagcccctgc gactcgggca cctgtctgga caagatcgat
1981 ggctacgagt gtgcctgtga gccgggtac acagggagca tgtgtaacat caacatcgat
2041 gagtgtgctg gcaacccctg ccacaacggg ggcacctgcg aggcaggcat caatggcttc
2101 acctgccgct gcccgcaggg ctaccacgac cccacctgcc tgtctgaggt caatgagtgc
2161 aacagcaacc cctgctcca cggggcctgc cgggacagcc tcaacgggta caagtgcgac
2221 tgtgacctg ggtggagtgg gaccaactgt gacatcaaca acaatgagtg tgaatccaac
2281 cctgtgtca acggggcacc ctgcaaagac atgaccagtg gctacgtgtg cactgcccg
2341 gaggcttca gcggctccaa ctgccagacc aacatcaacg agtgtgcgtc caacctatgt
2401 ctgaaccagg gcacgtgtat tgacgagctt gccgggtaca agtgcaactg cctgctgcc
2461 tacacagtg ccacgtgtga ggtggtgctg gcccctgtg ccccagccc ctgcagaaac
2521 ggcggggagt gcaggcaatc cgaggactat gagagcttct cctgtgtctg ccccacgggc
2581 tggcaagcag ggcagacctg tgaggctgac atcaacgagt gcgttctgag cccgtgccg
2641 cacggcgcac cctgccagaa caccacggc ggctaccgct gccactgcca ggcggctac
2701 agtggcgca actgcgagac cgacatcgac gactgccggc ccaaccctg tcaaacggg
2761 ggctcctgca cagacggcat caacacggcc ttctgcgact gcctgcccgg ctccggggc
2821 actttctgtg aggaggacat caacgagtgt gccagtgacc cctgccgcaa cggggccaac
2881 tgacggact gcgtggacag ctacacgtgc acctgcccc caggcttcag cgggatccac
2941 tgtgagaaca acacgcctga ctgcacagag agctcctgct tcaacgggtg cacctgcgtg
3001 gacggcatca actcgttcac ctgcctgtgt ccaccggct tcaaggcag ctactgccag
3061 cacgatgtca atgagtgcga ctcacagccc tgccctgatg gcggcactg tcaggacggc
3121 tgcggtcct acaggtgcac ctgccccag ggctacactg gccccactg ccagaacctt
3181 gtgactgggt gtgactcctc gccctgcaag aacggcgga aatgctggca gaccacacc
3241 cagtaccgct gcgagtgcc cagcggtgg accggcctt actgcgacgt gccagcgtg
3301 tcctgtgagg tggctgcgca gcgacaaggt gttgacgtg cccgctgtg ccagatgga

```

## Figura 18B

```

3361 gggctctgtg tggacgcggg caacacgcac cactgccgct gccaggcggg ctacacagge
3421 agctactgtg aggacctggt ggacgagtgc tcacccagcc cctgccagaa cggggccacc
3481 tgcacggact acctgggcgg ctactcctgc aagtgcgtgg ccggctacca cggggtgaac
3541 tgctctgagg agategacga gtgcctctcc caccctgcc agaacggggg cacctgectc
3601 gacctcccca acacctaaa gtgctcctgc ccacggggca ctcaggggtg gcactgtgag
3661 atcaacgtgg acgactgcaa tcccccggtt gaccccggtt cccggagccc caagtgcttt
3721 aacaacggca cctgcgtgga ccaggtgggc ggctacagct gcacctgccc gccgggcttc
3781 gtgggtgagc gctgtgaggg ggatgtcaac gagtgcctgt ccaatccctg cgacgccctg
3841 ggcacccaga actgcgtgca gcgcgtcaat gacttccact gcgagtgccg tgctggtcac
3901 accgggcgcc gctgcgagtc cgtcatcaat ggctgcaaag gcaagccctg caagaatggg
3961 ggcacctgcg ccgtggcctc caacaccgcc cgcgggttca tctgcaagtg ccctgcgggc
4021 ttcgagggcg ccacgtgtga gaatgacgct cgtacctgcg gcagcctgcg ctgcctcaac
4081 ggcggcacat gcattctcgg cccgcgcagc cccacctgcc tgtgcctggg ccccttcacg
4141 ggccccgaat gccagttccc ggccagcagc cctgcctggg gggcaaccc ctgctacaac
4201 caggggacct gtgagccac atccgagagc ccttctacc gttgcctgtg ccccgccaaa
4261 ttcaacgggc tcttgtgcca catcctggac tacagcttc 4299

```

Figura 19A

```

1  tcatctggaa  ttatgccgcg  cctgcgcccc  gctctgctgt  gggcgctgct  ggcgctctgg
61  ctgtgctgcg  cggcccccgc  gcatgcattg  cagtgtcgag  atggctatga  accctgtgta
121  aatgaaggaa  tgtgtgttac  ctaccacaat  ggcacaggat  actgcaaatg  tccagaaggc
181  ttcttggggg  aatattgtca  acatcgagac  ccctgtgaga  agaaccgctg  ccagaatggt
241  gggacttgtg  tggcccaggc  catgctgggg  aaagccacgt  gcgatgtgc  ctcagggttt
301  acaggagagg  actgccagta  ctcaacatct  catccatgct  ttgtgtctcg  accctgcctg
361  aatggcggca  catgccatat  gctcagccgg  gatacctatg  agtgcacctg  tcaagtctgg
421  tttacaggta  aggagtgcc  atggacggat  gcctgcctgt  ctcatccctg  tgcaaatgga
481  agtacctgta  ccaactgtgg  caaccagttc  tccctgcaat  gcctcacagg  cttcacaggg
541  cagaaatgtg  agactgatgt  caatgagtgt  gacattccag  gacactgcc  gcatgggtgg
601  acctgcctca  acctgcctgg  ttctaccag  tgccagtgcc  ctcagggtt  cacaggccag
661  tactgtgaca  gcctgtatgt  gcctgtgca  cctcacctt  gtgtcaatgg  aggacctgt
721  cggcagactg  gtgacttcac  ttttgagtgc  aactgccttc  caggttttga  agggagcacc
781  tgtgagagga  atattgatga  ctgccctaac  cacaggtgtc  agaatggagg  ggtttgtgtg
841  gatggggtca  acacttaca  ctgccgctgt  cccccacaat  ggacaggaca  gttctgcaca
901  gaggatgtgg  atgaatgcct  gctgcagccc  aatgcctgtc  aaaatggggg  cacctgtgcc
961  aaccgcaatg  gaggctatgg  ctgtgtatgt  gtcaacggct  ggagtggaga  tgactgcagt
1021  gagaacattg  atgattgtgc  cttcgctcc  tgtactccag  gctccacctg  catcgacctg
1081  gtggcctcct  tctcttgcac  gtgcccagag  ggggaaggcag  gtctcctgtg  tcatctggat
1141  gatgcatgca  tcagcaatcc  ttgccacaag  ggggcaactgt  gtgacacca  cccctaaat
1201  gggcaatata  tttgcacctg  cccacaaggc  tacaaggggg  ctgactgcac  agaagatgtg
1261  gatgaatgtg  ccatggccaa  tagcaatcct  tgtgagcatg  caggaaaatg  tgtgaacacg
1321  gatggcgctc  tccactgtga  gtgtctgaag  ggttatgcag  gacctcgttg  tgagatggac
1381  atcaatgagt  gccattcaga  ccctgccag  aatgatgcta  cctgtctgga  taagattgga
1441  ggcttcacat  gtctgtgcat  gccaggtttc  aaagggtgtc  attgtgaatt  agaaataaat
1501  gaatgtcaga  gcaacccttg  tgtgaacaat  gggcagtggt  tggataaagt  caatcgtttc
1561  cagtgcctgt  gtctcctgg  tttcactggg  ccagtttgcc  agattgatat  tgatgactgt
1621  tccagtactc  cgtgtctgaa  tggggcaaa  tgtatcgatc  acccgaatgg  ctatgaatgc
1681  cagtgtgcca  caggttcac  tgggtgtgtg  tgtgaggaga  acattgaca  ctgtgacccc
1741  gatccttgcc  accatggtca  gtgtcaggat  ggtattgatt  cctacacctg  catcctaatt
1801  cccgggtaca  tgggcgccat  ctgcagtgac  cagattgatg  aatgctacag  gatcccttgc
1861  ctgaacgatg  gtcgctgcat  tgacctggtc  aatggctacc  agtgcaactg  ccagccaggc
1921  acgtcagggg  ttaattgtga  aattaatttt  gatgactgtg  caagtaacce  ttgatccat
1981  ggaatctgta  tggatggcat  taatcgctac  agttgtgtct  gctcaccagg  attcacaggg
2041  cagagatgta  acattgacat  tgatgagtgt  gcctccaatc  cctgtcgcaa  gggtgcaaca
2101  tgtatcaacg  gtgtgaatgg  tttccgctgt  atatgccccg  agggacccca  tccccccagc
2161  tgcactcac  aggtgaacga  atgcctgagc  aatccctgca  tccatggaaa  ctgtactgga
2221  ggtctcagtg  gatataagtg  tctctgtgat  gcaggctggg  ttggcatcaa  ctgtgaagtg
2281  gacaaaaatg  aatgcctttc  gaatccatgc  cagaatggag  gaacttgtga  caatctgggtg
2341  aatggataca  ggtgtacttg  caagaagggc  tttaaaggct  ataactgcca  ggtgaatatt
2401  gatgaatgtg  cctcaaatcc  atgcctgaac  caaggaacct  gctttgatga  cataagtggc
2461  tacacttgcc  actgtgtgct  gccatacaca  ggcaagaatt  gtcagacagt  attggctccc
2521  tgttccccaa  acccttgtga  gaatgctgct  gtttgcaaag  agtcaccaa  ttttgagagt
2581  tatacttgct  tgtgtgctcc  tggctggcaa  ggtcagcggg  gtaccattga  cattgacgag
2641  tgtatctcca  agccctgcat  gaaccatggt  ctctgccata  acaccaggg  cagctacatg
2701  tgtgaatgtc  caccaggctt  cagtggatg  gactgtgagg  aggacattga  tgactgcctt
2761  gccaatcctt  gccagaatgg  aggttctctg  atggatggag  tgaatacttt  ctctgcctc
2821  tgcttccgg  gtttactcgg  ggataagtgc  cagacagaca  tgaatgagtg  tctgagtgaa
2881  ccctgtaaga  atggagggac  ctgctctgac  tacgtcaaca  gttacacttg  caagtgccag
2941  gcaggatttg  atggagtcca  ttgtgagaac  aacatcaatg  agtgcactga  gagctcctgt
3001  tccaatggtg  gcacatgtgt  tgatgggatt  aactccttct  cttgcttgtg  cctgtgggtg
3061  ttcactggat  ccttctgcct  ccatgagatc  aatgaatgca  gctctcatcc  atgcctgaat
3121  gagggaaact  gtgttgatgg  cctgggtacc  taccgctgca  gctgccccct  gggctacact
3181  gggaaaaact  gtcagacct  ggtgaatctc  tgcagtcggg  ctccatgtaa  aaacaaaggg
3241  acttgtgttc  agaaaaaac  agagtcccag  tgcctatgtc  catctggatg  ggctgggtgc

```

## Figura 19B

```

3301 tattgtgacg tgcccaatgt ctcttgtgac atagcagcct ccaggagagg tgtgcttgtt
3361 gaacacttgt gccagcactc aggtgtctgc atcaatgctg gcaacacgca ttactgtcag
3421 tgccccctgg gctatactgg gagctactgt gaggagcaac tcgatgagtg tgcgtccaac
3481 ccctgccagc acggggcaac atgcagtgac ttcattggg gatacagatg cgagtgtgtc
3541 ccaggctatc aggggtgcaa ctgtgagtat gaagtggatg agtgccagaa tcagccctgc
3601 cagaatggag gcacctgtat tgaccttgtg aaccatttca agtgctcttg cccaccaggc
3661 actcggggcc tactctgtga agagaacatt gatgactgtg cccgggggtcc ccattgcctt
3721 aatggtggtc agtgeatgga taggattgga ggctacagtt gtctgtgctt gcctggcttt
3781 gctggggagc gttgtgaggg agacatcaac gagtgcctct ccaacccctg cagctctgag
3841 ggcagcctgg actgtataca gctcaccaat gactacctgt gtgtttgccg tagtgccttt
3901 actggccggc actgtgaaac ctctctgat gtgtgtcccc agatgccctg cctgaatgga
3961 gggacttgtg ctgtggccag taacatgect gatggtttca tttgccgttg tccccggga
4021 tttccgggg caaggtgcca gacagctgt ggacaagtga aatgtaggaa gggggagcag
4081 tgtgtgcaca ccgcctctgg acccctctgc ttctgcccc gtccccggga ctgagagtca
4141 ggctgtgcca gtagccctg ccagcacggg ggcagctgce accctcagcg ccagcctcct
4201 tattactcct gcc 4213

```

Figura 20A

```

77          atgg ggccggggggc ccgtggccgc cgccgcccgc gtcgcccgat
121 gtcgcccga ccccccaccg caccctgctg ggcctgccc ctgctgctgc tgcctagcggg
181 gccgggggct gcagcccccc cttgcctgga cggagcccc tgtgcaaagt gaggctcgttg
241 caccagctg ccctcccggg aggctgctg cctgtgccc cctggctggg tgggtgagcg
301 gtgtcagctg gaggaccctt gtcactcagg cccctgtgct ggccgtggtg tctgccagag
361 ttcagtgggtg gctggcaccg cccgattctc atgcccgtgc ccccgtggct tccgaggccc
421 tgactgctcc ctgccagatc cctgcctcag cagcccttgt gccacgggtg cccgctgctc
481 agtggggccc gatggacgct tccctctgctc ctgccaccct ggctaccagg gccgcagctg
541 ccgaagcgac gtggatgagt gccgggtggg tgagccctgc cgccatggtg gcacctgcct
601 caacacacct ggctccttcc gctgccagtg tccagctggc tacacagggc cactatgtga
661 gaaccccgcg gtgccctgtg caccctcacc atgcccgtaac gggggcacct gcaggcagag
721 tggcgacctc acttaagact gtgctgtctc tccctgggtt gagggtcaga attgtgaagt
781 gaacgtggac gactgtccag gacaccgatg tctcaatggg gggacatgcy tggatggcgt
841 caacacctat aactgccagt gccctcctga gtggacaggg cagttctgca cggaggacgt
901 ggatgagtg cagctgcagc ccaacgcctg ccacaatggg ggtacctgct tcaacacgct
961 gggtgcccac agctgctgtg gtgtcaatgg ctggacaggg gagagctgca gtcagaatat
1021 cgatgactgt gccacagccg tgtgcttcca tggggccacc tgccatgacc gcgtggcttc
1081 tttctactgt gcctgcccc a tgggcaagac tggcctcctg tgtcacctgg atgacgcctg
1141 tgtcagcaac ccctgccacg aggatgctat ctgtgacaca aatccggtga acggcccggc
1201 catttgcaac tgtcctccc gcttcacggg tggggcatgt gaccaggatg tggacgagtg
1261 ctctatcggc gccaaacctt gcgagcactt gggcaggtgc gtgaacacgc agggctcctt
1321 cctgtgccag tgcggtegtg getacactgg acctcctgtg gagaccgatg tcaacgagtg
1381 tctgtcgggg ccctgccgaa accaggcccac gtgcctcgac cgcataggcc agttcacctg
1441 tatctgtatg gcaggcttca caggaacct a tggcaggtg gacattgacg agtgtcagag
1501 tagccctgt gtcaacggtg gggctgcaa ggaccgagtc aatggcttca gctgcacctg
1561 ccctcggggc ttcagcggct ccacgtgtca gctggacgtg gacgaatgcy ccagcacgcc
1621 ctgcaggaat ggcgccc aat gcgtggacca gcccgatggc tacgagtgcc gctgtgccga
1681 gggctttgag ggcacgctgt gtgatcgcaa cgtggacgac tgcctcccctg acctatgcca
1741 ccattgctgc tgcgtggatg gcctcgcag cttctcatgt gcctgtgctc ctggctacac
1801 gggcacacgc tgcgagagcc aggtggacga atgcccagc cagccctgcc gccatggcgg
1861 caaatgccta gacctgggtg acaagtacct ctgcccgtgc ccttctggga ccacaggtgt
1921 gaactgcgaa gtgaacattg acgactgtgc cagcaacccc tgcaccttg gagtctgccg
1981 tgatggcatc aaccgctacg actgtgtctg ccaacctggc ttcacagggc cctttgtaa
2041 cgtggagatc aatgagtggt cttccagccc atgcccggag ggaggttctt gttggatgg
2101 ggaaaatggc ttcgctgccc tctgcccgc tggctccttg ccccactctt gctcccccc
2161 gagccatccc tgtgccc atg agccctgcag tcacggcatc tgcctatgat cacctggcgg
2221 gttccgctgt gtgtgtgagc ctggctggag tggccccgc tgcagccaga gctggcccg
2281 agacgcctgt gactcccagc cgtgcagggc cgggtgggaca tgcagcagcy atggaatggg
2341 tttccactgc acctgcccgc ctgggtgtcca gggacgtcag tgtgaactcc tctccccctg
2401 cccccgaac ccctgtgagc atggggggcc ctgagagctt gccctggcc agctgcctgt
2461 ctgctcctgc ccccagggtt ggcaaggccc acgatgccag caggatgtgg acgagtgctc
2521 tggccccgca ccctgtggcc ctcatggtat ctgcaccaac ctggcagggg gtttcagctg
2581 caactgccat ggagggtaca ctggcccttc ctgcatcag gacatcaatg actgtgaccc
2641 caacccatgc ctgaacggtg gctcgtgcca agacggcgtg ggctcctttt cctgctcctg
2701 cctccctggt ttgcggggcc cacgatgcgc ccgcatgtg gatgagtgcc tgagcaaccc
2761 ctgcggcccg ggcacctgta ccgaccacgt ggctccttc acctgcacct gcccgccagg
2821 ctacggaggc ttcactgcy aacaggacct gccgactgc agccccagct cctgcttcaa
2881 tggcgggacc tgtgtggacg gcgtgaactc gttcagctgc ctgtgcccgc ccggctacac
2941 aggagcccac tgcacaatg aggcagaccc ctgectctcg cggccctgcc tacacggggg
3001 cgtctgcagc gccgcccacc ctggcttccg ctgcacctgc ctgagagct tcaacggccc
3061 gcagtgccag acgctgggtg attggtgcag ccgcccagct tgtcaaacg ggggtcgtg
3121 cgtccagact ggggctatt gcctttgtcc cctggatgg agcggacgcc tctgtgacat
3181 ccgaagcttg ccctgcaggg aggcgcagc ccagatcggg gtgcggctgg agcagctgtg
3241 tcaggcgggt gggcagtggt tggatgaaga cagctcccac tactgctgt gcccagaggg
3301 ccgtactggt agccactgtg agcaggaggt ggacctgc tggcccagc cctgccagca

```

## Figura 20B

```

3361 tggggggacc tgccgtggct atatgggggg ctacatgtgt gagtgtcttc ctggctacaa
3421 tggtgataac tgtgaggacg acgtggacga gtgtgcctcc cagccctgcc agcacggggg
3481 ttcattgcatt gacctcgtgg cccgctatct ctgctcctgt ccccaggaa cgctgggggt
3541 gctctgcgag attaatgagg atgactgcgg cccaggccca ccgctggact cagggccccg
3601 gtgcctacac aatggcacct gcgtggacct ggtgggtggt tccgctgca cctgtcccc
3661 aggatacact ggtttgcgct gcgaggcaga catcaatgag tgtcgctcag gtgcctgcca
3721 cgeggcacac acccgggact gcctgcagga cccaggogga ggtttccgtt gcctttgtca
3781 tgetggette tcaggtctc gctgtcagac tgtcctgtct cctgcgagt cccagccatg
3841 ccagcatgga ggccagtgcc gtctagccc gggctctggg ggtgggctga ccttcacctg
3901 tcaactgtgcc cagccgttct ggggtccgcg ttgcgagcgg gtggcgcgct cctgccggga
3961 gctgcagtgc ccggtgggcg tcccatgcc gcagacgcc cggggccgc gctgcgctg
4021 cccccaggg ttgtcgggac cctcctgcc 4050

```

Figura 21A

```

91                                     atgcagcccc cttcactgct gctgctgctg
121 ctgctgctgc tgetgetatg tgtctcagtg gtcagaccca gagggctgct gtgtgggagt
181 ttcccagaac cctgtgccaa tggaggcacc tgcttgagcc tgtctctggg acaagggacc
241 tgccagtgtg cccctggctt cctgggtgag acgtgccagt ttcctgacc ctgccagaac
301 gccagctctt gccaaaatgg aggcagctgc caagccctgc tccccgctcc cctagggctc
361 cccagctctc cctctccatt gacaccagc tttctgtgca cttgcctccc tggcttcact
421 ggtgagagat gccaggccaa gcttgaagac ccttgtctc cctcctctctg ttccaaaagg
481 ggccgctgcc acatccaggc ctogggccgc ccacagtget cctgcatgcc tggatggaca
541 ggtgagcagt gccagctctg ggacttctgt tcagccaacc catgtgttaa tggaggggtg
601 tgtctggcca catacccca gatccagtg cactgcccac cgggcttctga gggccatgcc
661 tgtgaacgtg atgtcaacga gtgcttccag gacccaggac cctgccccaa aggcacctcc
721 tgccataaca cctgggctc ctccagtgcc ctctgcccctg tggggcagga gggctccagt
781 tgtgagctgc gggcaggacc ctgcccctct aggggtgtt cgaatggggg cacctgccag
841 ctgatgccag agaaagactc cacctttcac ctctgctct gtccccagg tttcataggc
901 ccagactgtg aggtgaatcc agacaactgt gtcagccacc agtgtcagaa tgggggctc
961 tgccaggatg ggtggacac ctacacctgc ctctgcccag aaacctggac aggtggggac
1021 tgctccgaag atgtggatga gtgtgagacc caggtcccc ctactgcag aaacgggggc
1081 acctgccaga actctgctgg tagctttcac tgcgtgtgtg tgagtggctg gggcggcaca
1141 agctgtgagg agaacctgga tgaactgatt gctgccacct gtgccccggg atccacctgc
1201 attgaccggg tgggetctt ctctgctctc tgccccctg gacgcacagg actcctgtgc
1261 cacttggaaag acatgtgtct gagccagccg tgccatgggg atgcccattg cagcaccaac
1321 cccctcacag gctccacct ctgctgtgt gatggcccag caaggcccaa gtcctgtga acatggcgg
1381 caggacctgg acgagtgtct gatggcccag caaggcccaa gtcctgtga acatggcgg
1441 tctgctca acactcctgg ctcttcaac tgctctgtc cacctggcta cacaggctcc
1501 cgttgtgagg ctgatcaca tgagtgcctc tcccagccct gccaccagg aagcacctgt
1561 ctggacctac ttgccacctt ccaactgcctc tgcccgcag gcttagaagg gcagctctgt
1621 gaggtggaga ccaacgagtg tgctcagct cctgctga accacggga ttgccatgac
1681 ctgctcaacg gcttccagtg catctgctg cctggattct ccggcaccg atgtgaggag
1741 gatatcgatg agtgacaga ctctccctgt gccaatggtg ggcagtcca ggaccagcct
1801 ggagccttcc actgcaagtg tctcccagge tttgaagggc caegctgtca aacagaggtg
1861 gatgactgcc tgagtgacc atgtcccgtt ggagccagct gccttgatct tccaggagcc
1921 ttcttttgc tctgcccctc tggtttcaca ggcagctct gtgaggttcc cctgtgtgt
1981 cccaacctgt gccagcccaa gcagatatgt aaggaccaga aagacaaggc caactgcctc
2041 tgtctgatg gaagccctgg ctgtgcccc cctgaggaca actgcacctg ccaccacggg
2101 cactgccaga gatectcatg tgtgtgtgac gtgggttgg cggggccaga gtgtgaggca
2161 gagctagggg gctgcatctc tgaccctgt gccatgggg ggacctgcta cccccagccc
2221 tctggctaca actgcacctg cctacagggc tacacaggac ccacctgtag tgaggagatg
2281 acagcttgtc actcagggcc atgtctcaat ggcgctcct gcaacctag cctggaggc
2341 tactactgca cctgcccctc aagccacaca gggcccagt gccaaaccag cactgactac
2401 tgtgtgtctg cccctgctt caatgggggt acctgtgtga acaggcctgg caccttctcc
2461 tgctctgtg ccatggctt ccagggcccg cgtgtgagg gaaagctccg cccagctgt
2521 gcagacagcc cctgtaggaa tagggcaacc tgccaggaca gccctcaggg tccccgctgc
2581 ctctgcccc ctggtacac cggaggcagc tgccagactc tgatggactt atgtgccag
2641 aagccctgcc cacgcaatc ccaactgcctc cagactgggc cctcctcca ctgcttgtgc
2701 ctccagggat ggaccgggccc tctctgcaac ctccaactgt cctcctgcca gaaggtgca
2761 ctgagccaag gcatagacgt ctcttccctt tgccacaatg gaggcctctg tgtgacagc
2821 ggcccctcct atttctgcca ctgcccctt ggattccaag gcagctgtg ccaggatcac
2881 gtgaacccat gtgagtcag gcttgcccag aacggggcca cctgcatggc ccagcccagt
2941 ggttatctct gccagtgtc cccaggtac gatggacaga actgctcaa ggaactcgat
3001 gcttgtcagt cccaacctg tcacaacctt ggaacctgta ctcccaacc tggaggatc
3061 cactgtgctt gcctccagg ctttgtgggg ctacgctgtg agggagactt ggacgagtgt
3121 ctggaccagc cctgccacc cacaggcact gcagcctgcc actctctggc caatgcttc
3181 tactgccagt gtctgctgg acacacagggc cagtgggtgt aggtggagat agaccctgc
3241 cacagccaac cctgctttca tggagggacc tgtgaggcca cagcaggatc acccctgggt
3301 ttcactctgcc actgccccaa gggttttgaa ggccccact gcagccacag ggcccctcc

```

Figura 21B

```
3361 tgcggcttcc atcaactgcc aacaggagge ctgtgtctgc cctcccctaa gccaggcttc
3421 ccaccacgct gtgcttgcct cagtggctat gggggtcctg actgctgac cccaccagct
3481 cctaaaggct gtggccctcc ctcccctatg ctatacaatg gcagctgctc agagaccacg
3541 ggcttggggg gcccaggctt tegatgctcc tgcctcaca gctctccagg gccccggtgt
3601 cagaaacccg ga
```

Figura 22A

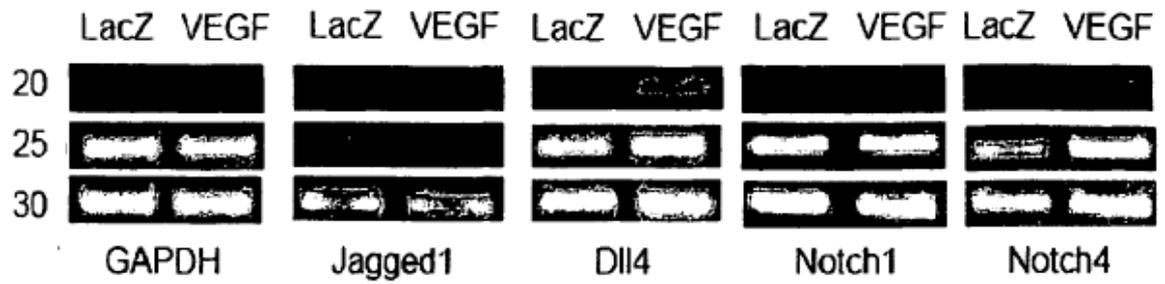


Figura 22B

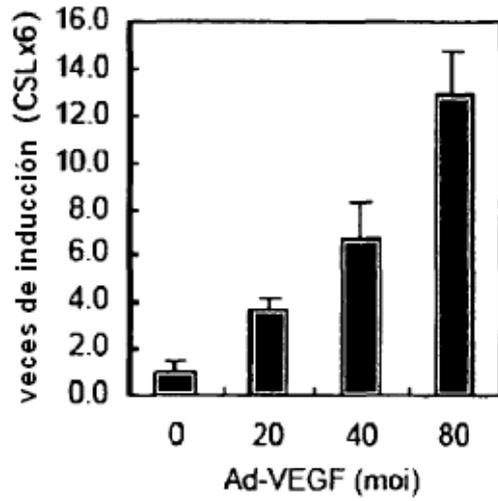


Figura 22C

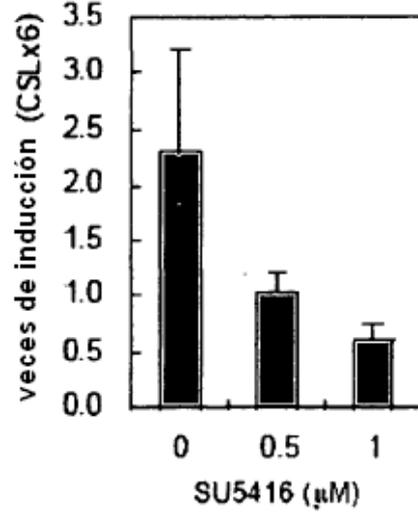


Figura 22D



Figura 22E

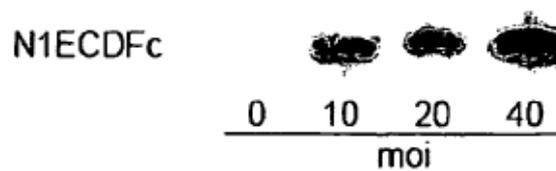


Figura 22F

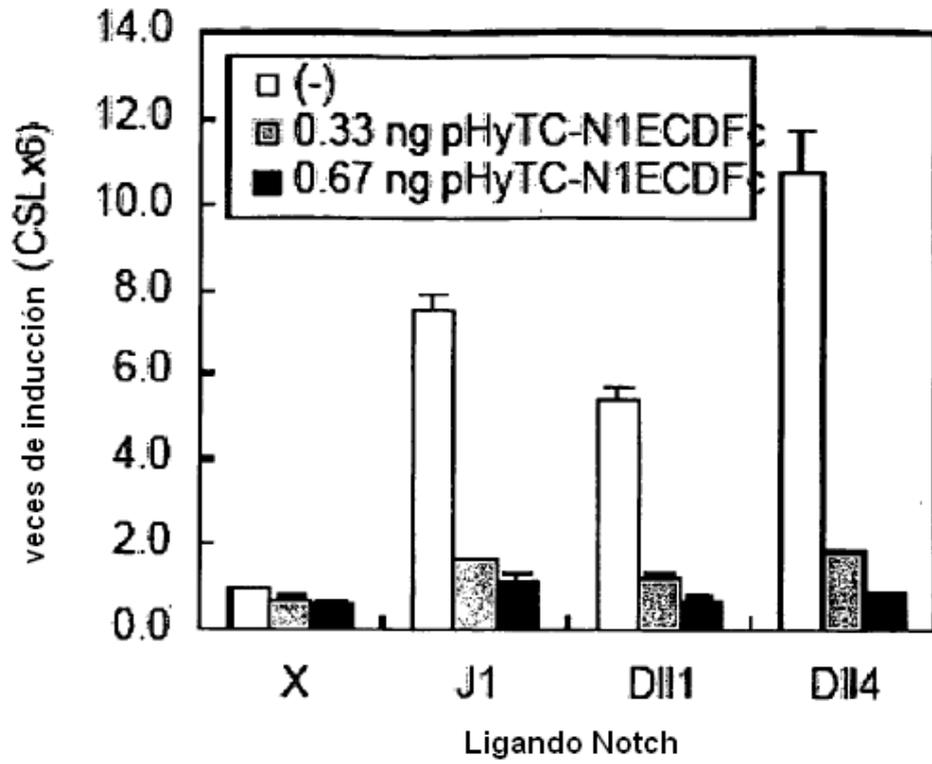


Figura 22G

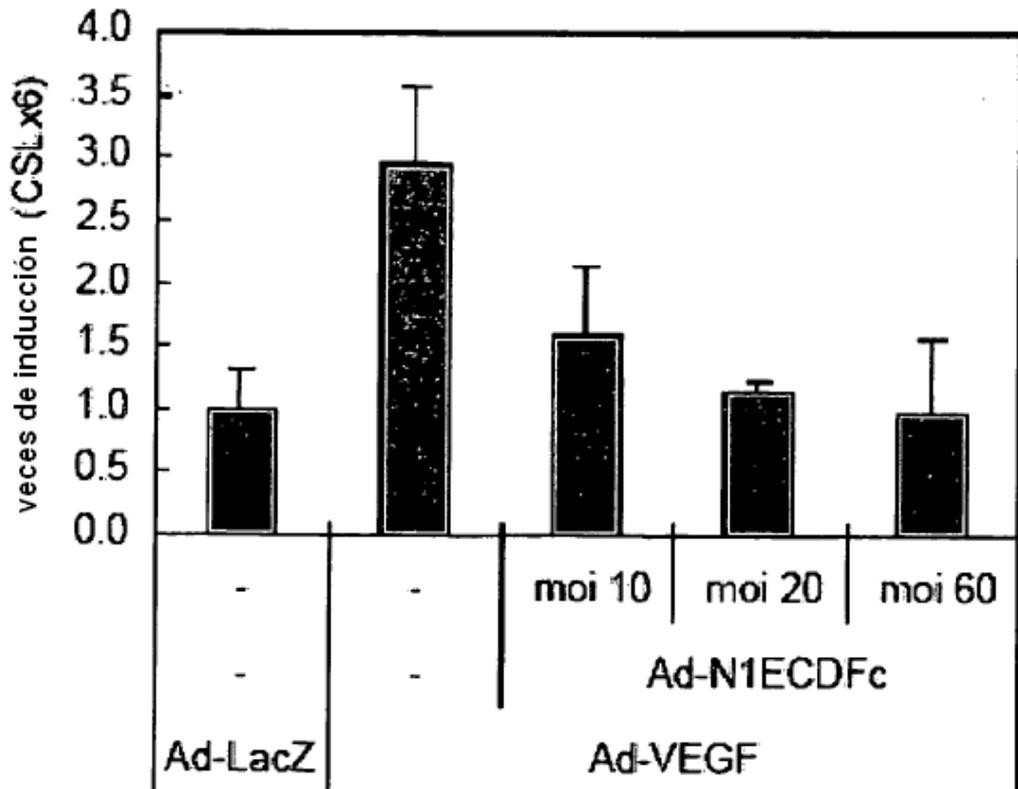


Figura 22H

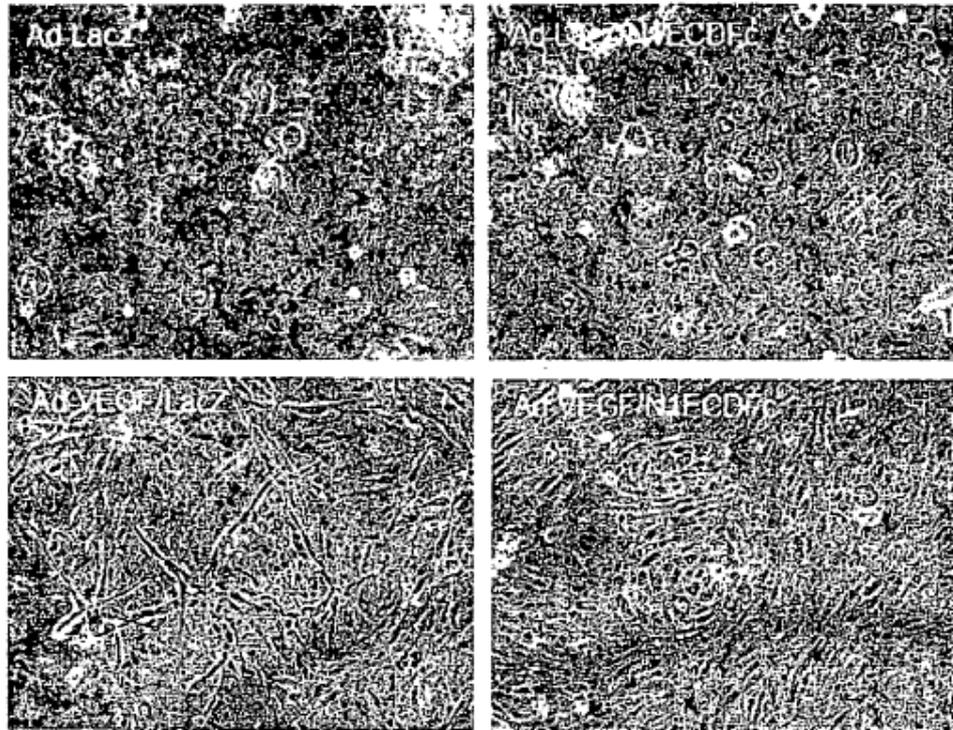


Figura 22I

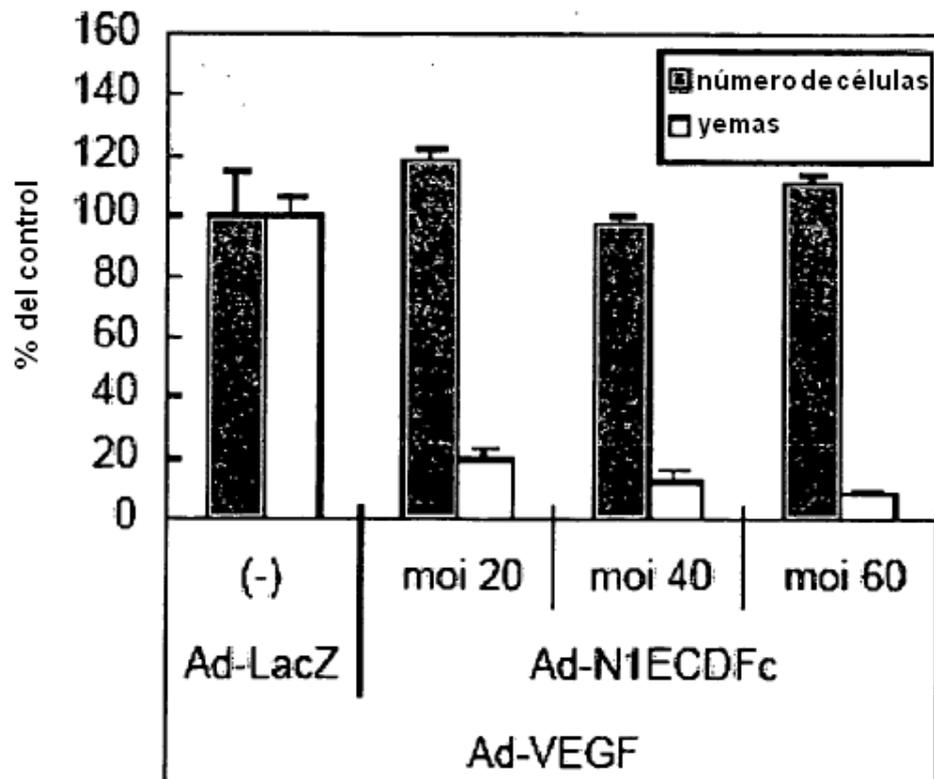


Figura 23A

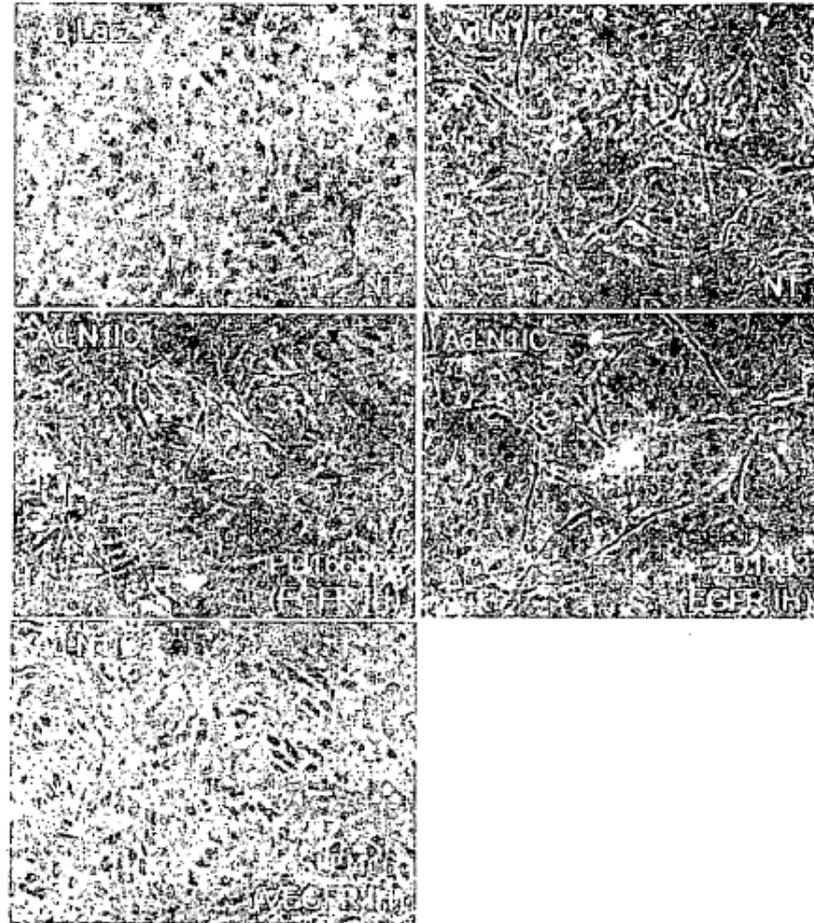


Figura 23B

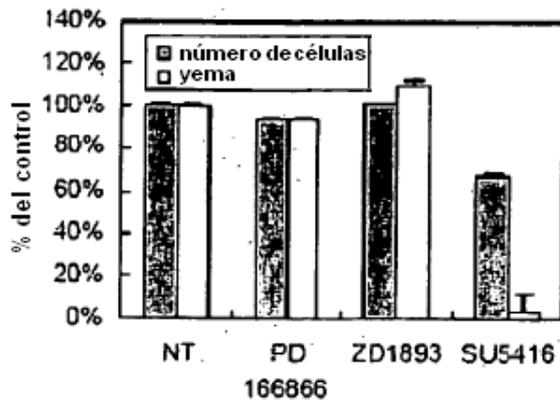


Figura 23C

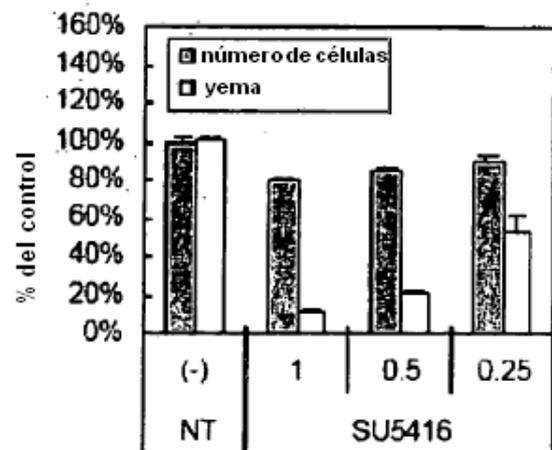


Figura 23D

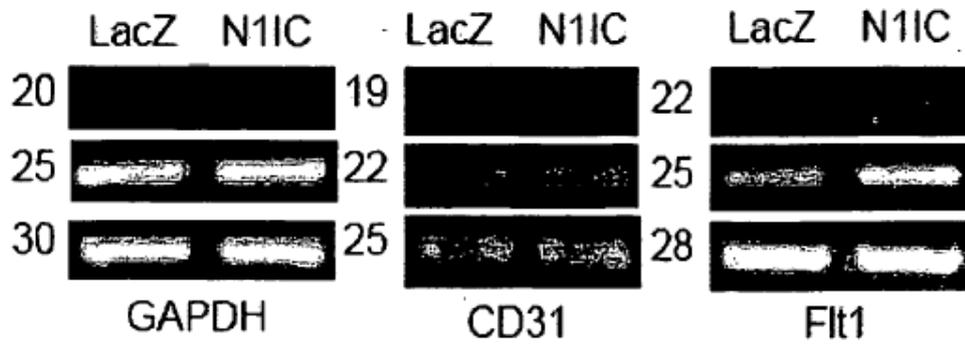


Figura 23E

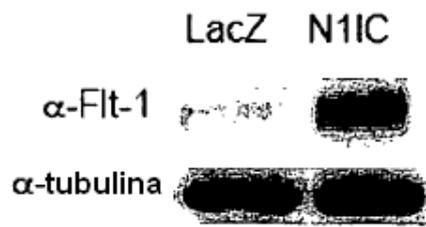


Figura 23F

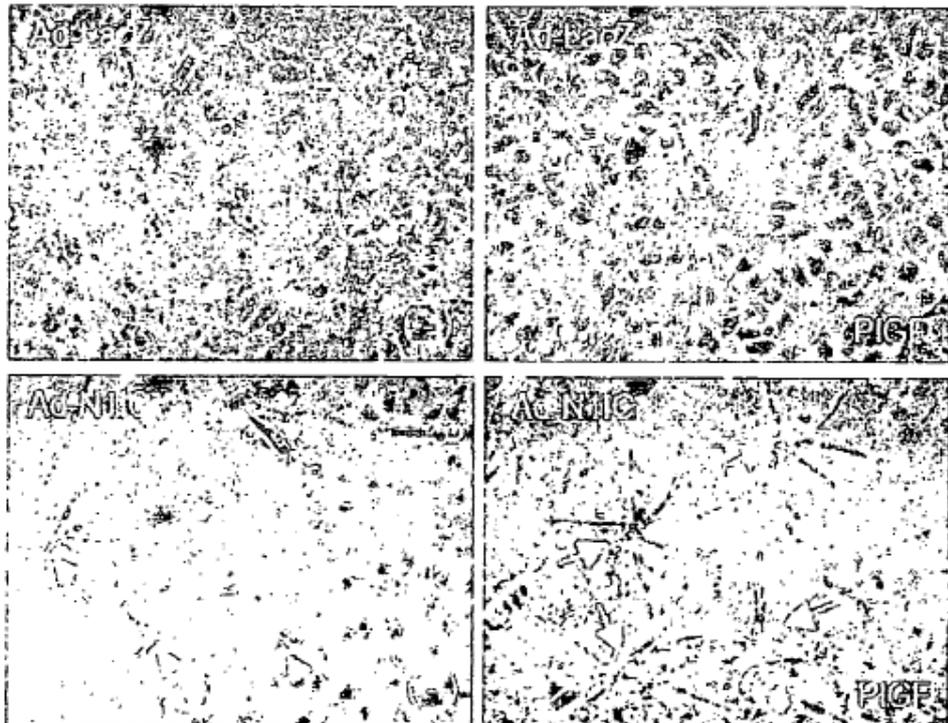


Figura 23G

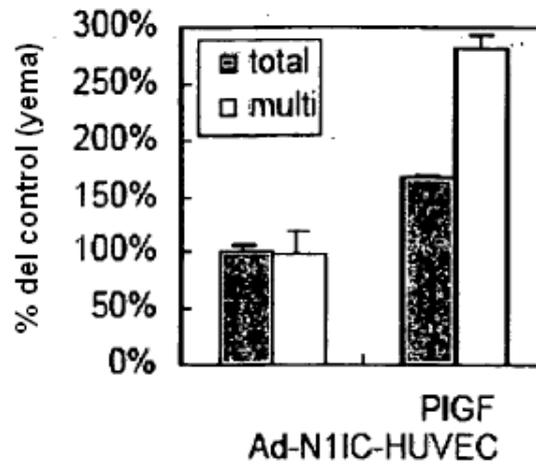


Figura 23H

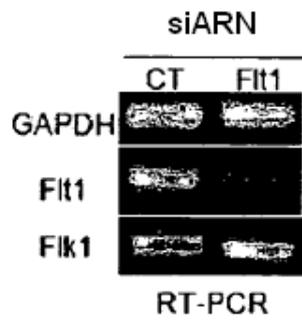


Figura 23I

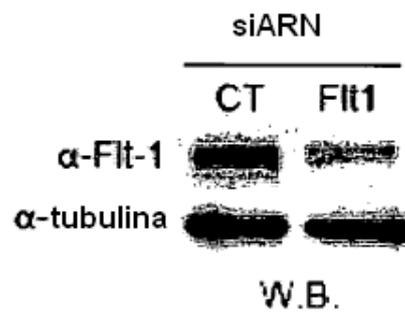


Figura 23J

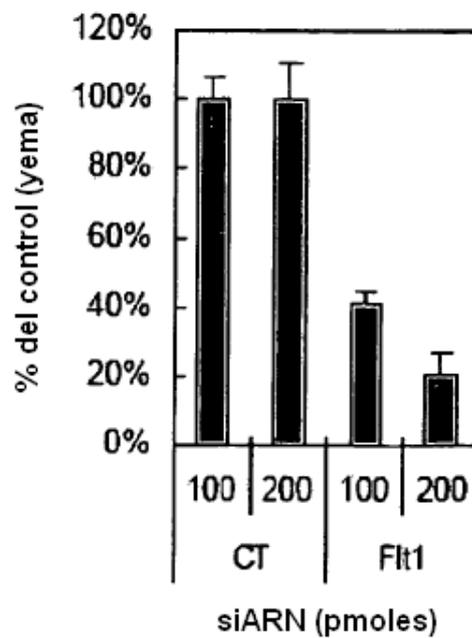


Figura 24A

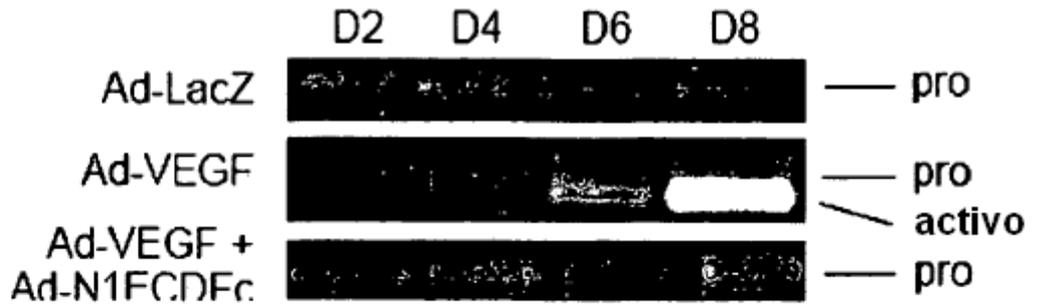


Figura 24B

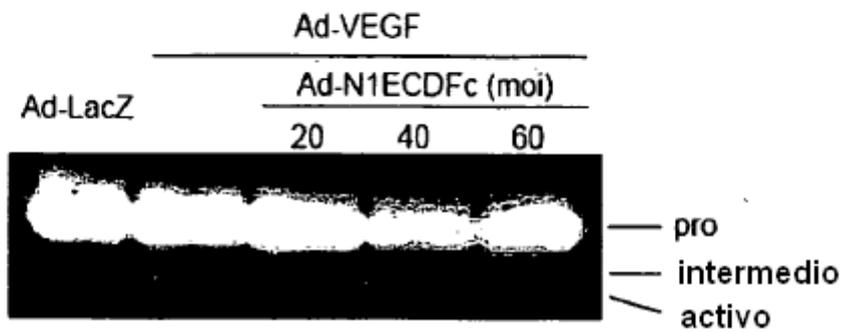


Figura 24C

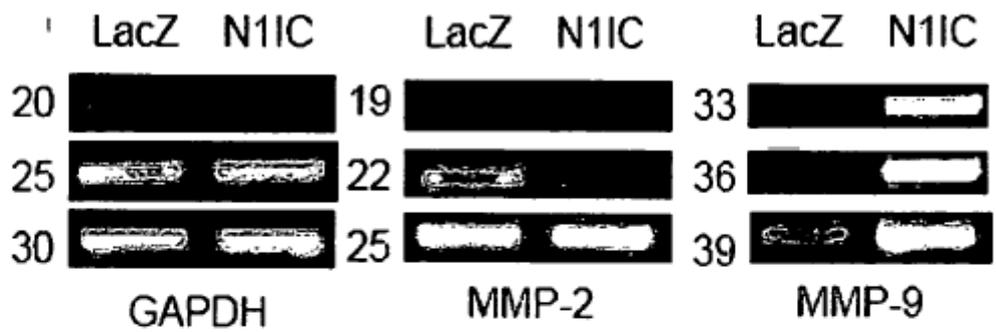


Figura 24D

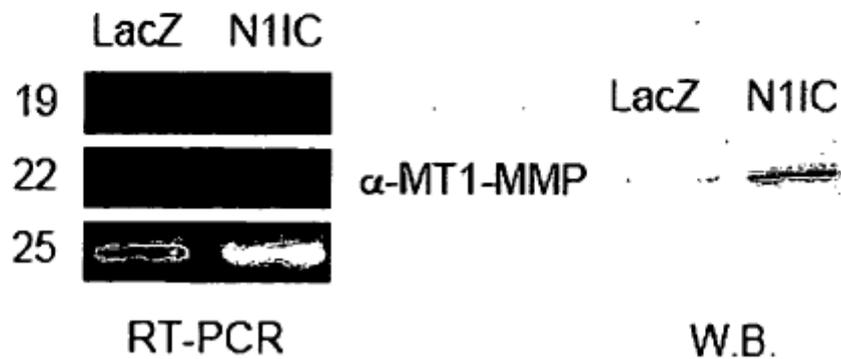


Figura 24E

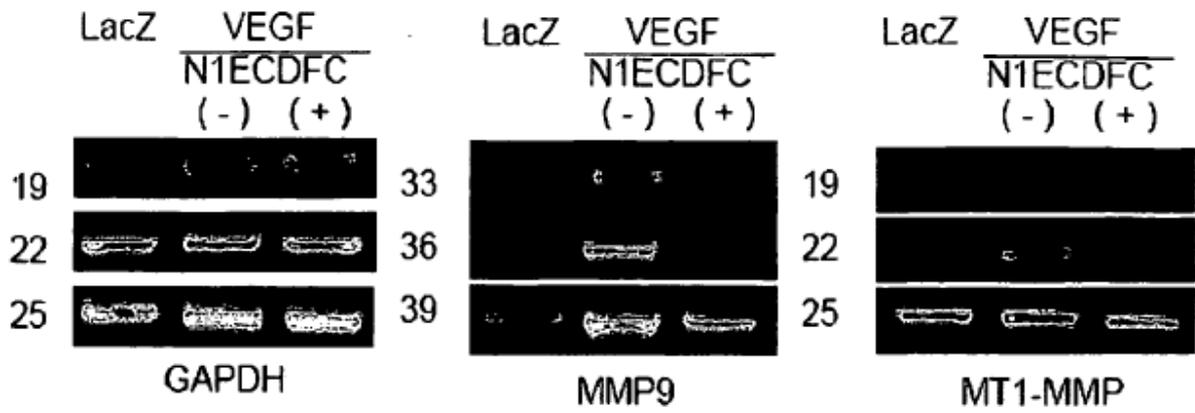


Figura 25A

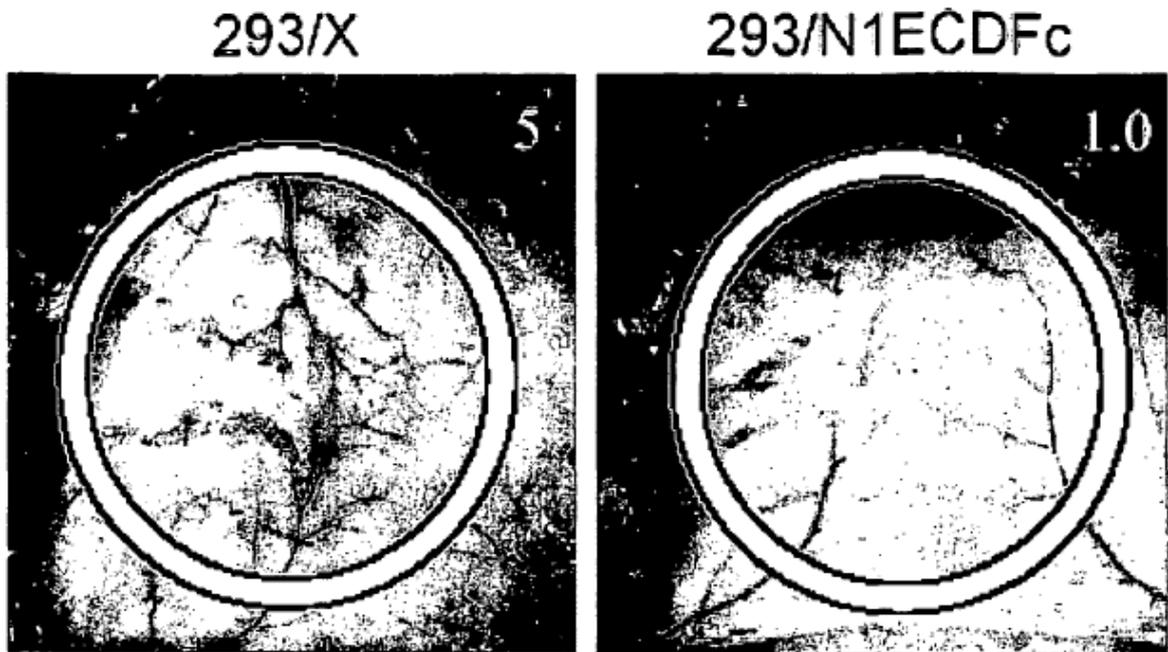


Figura 25B

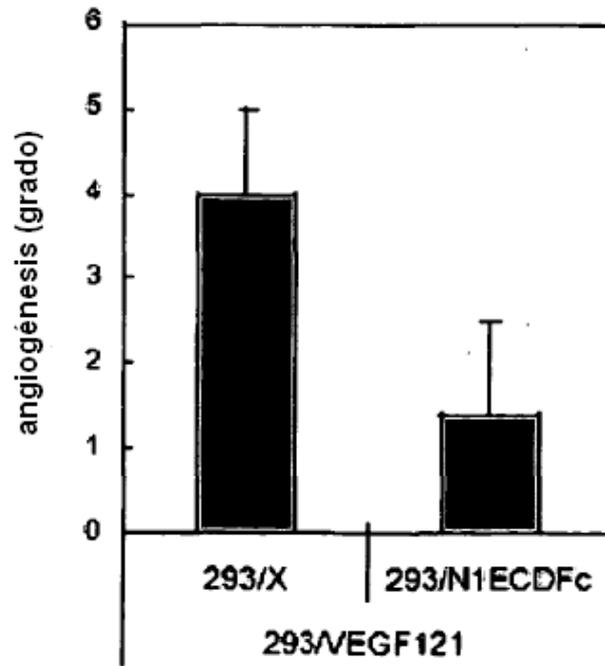


Figura 25C

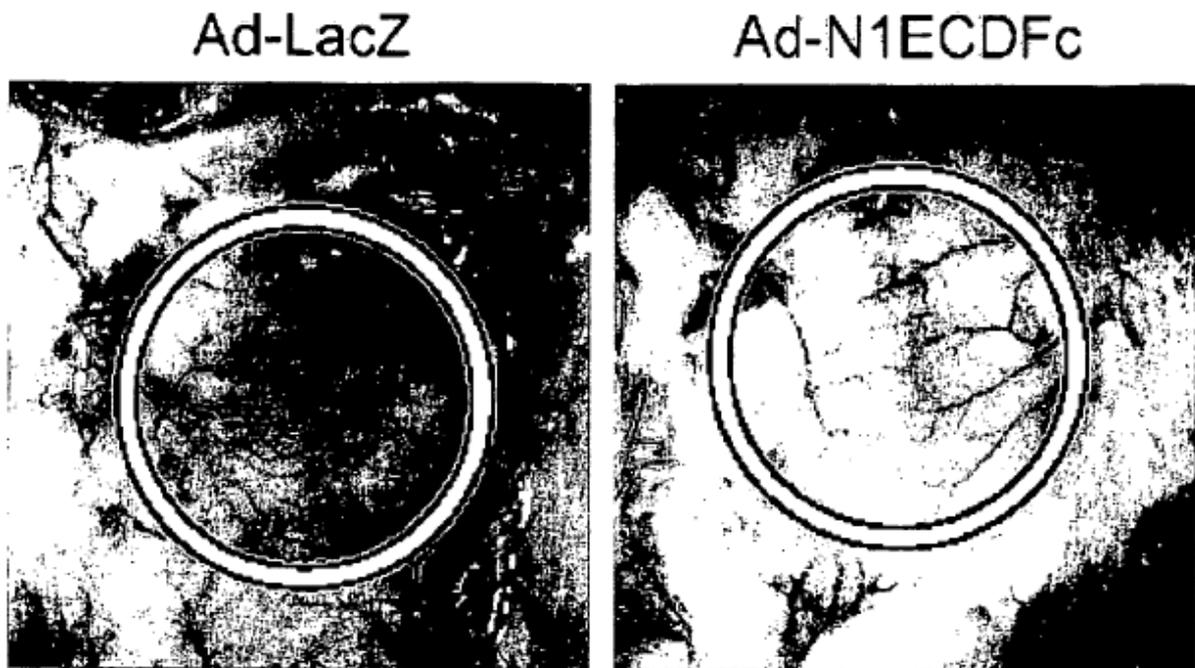


Figura 25D

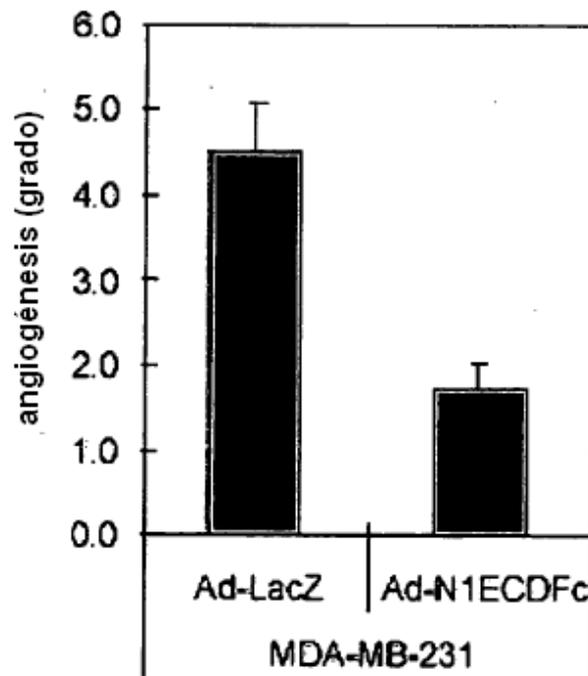


Figura 26A

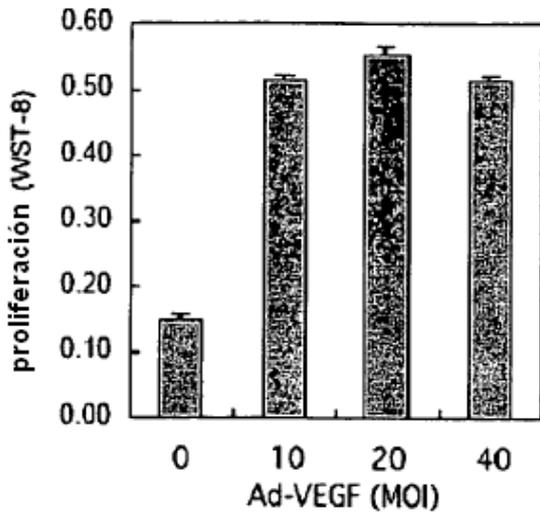


Figura 26B

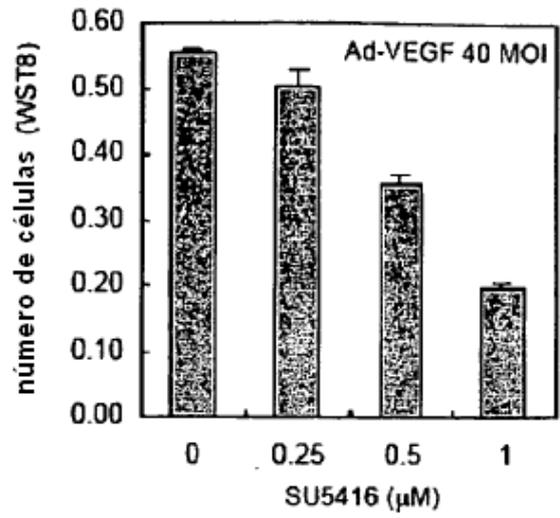


Figura 27A

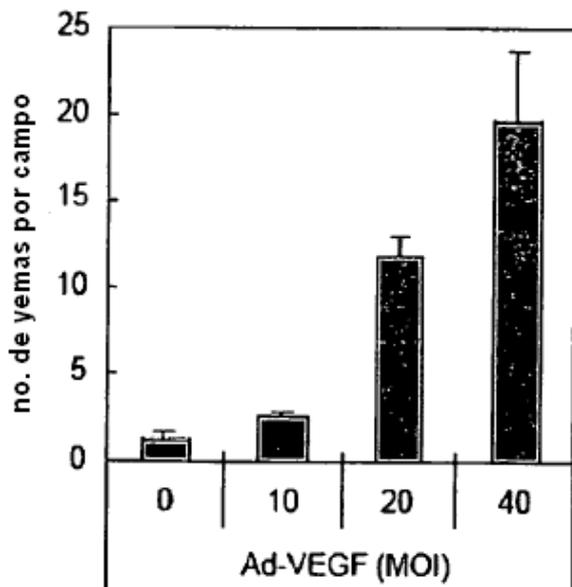


Figura 27B

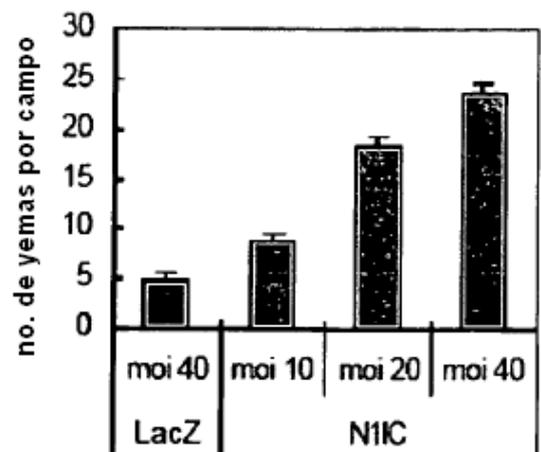


Figura 28A

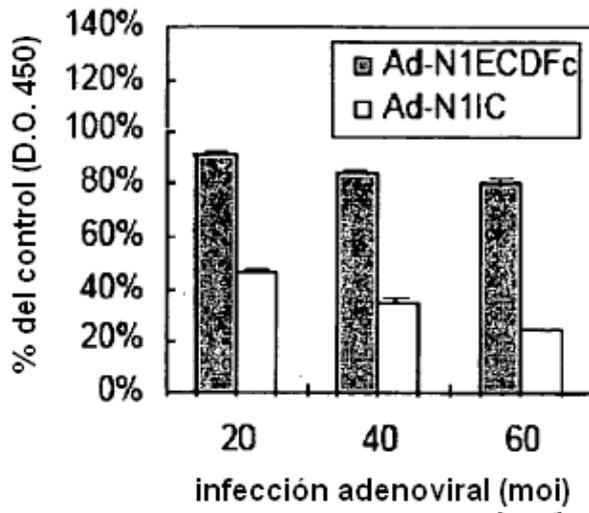


Figura 28B

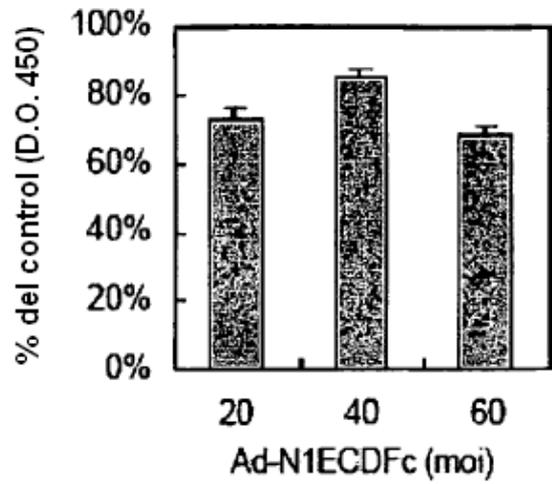


Figura 29

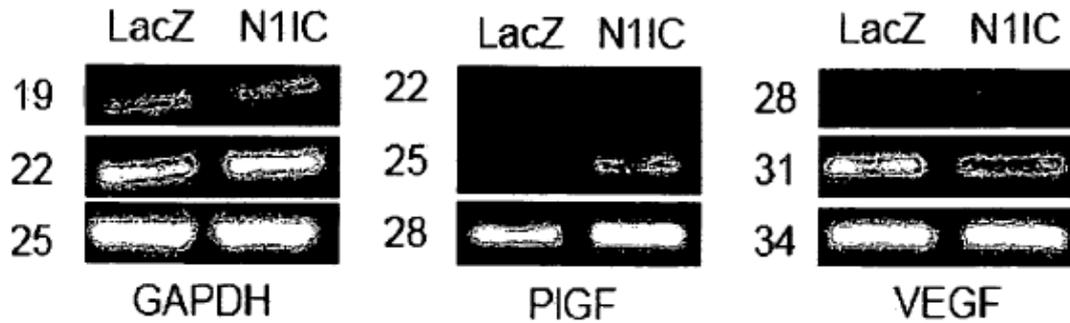


Figura 30A

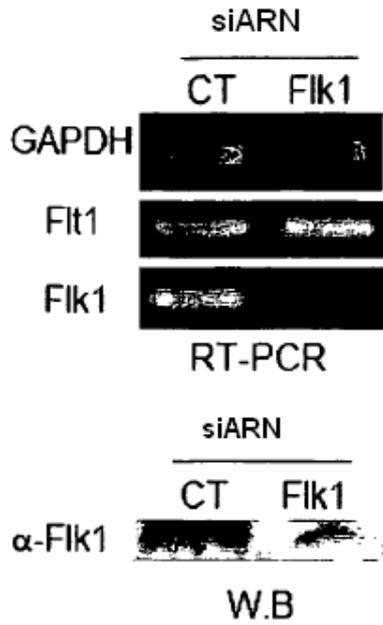


Figura 30B

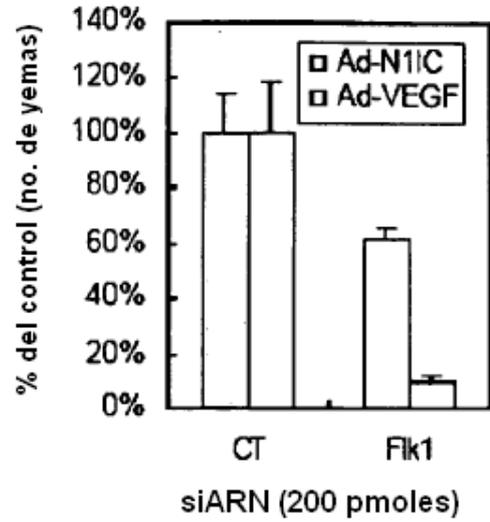


Figura 30C

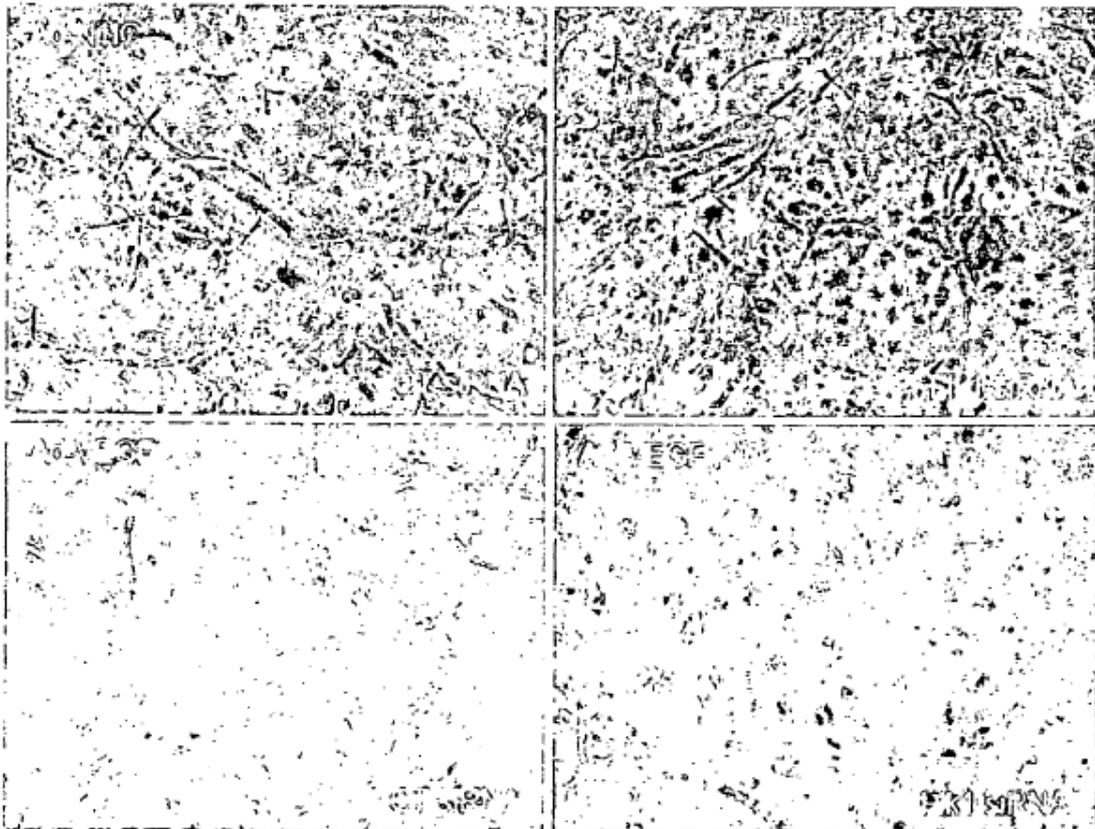


Figura 31A

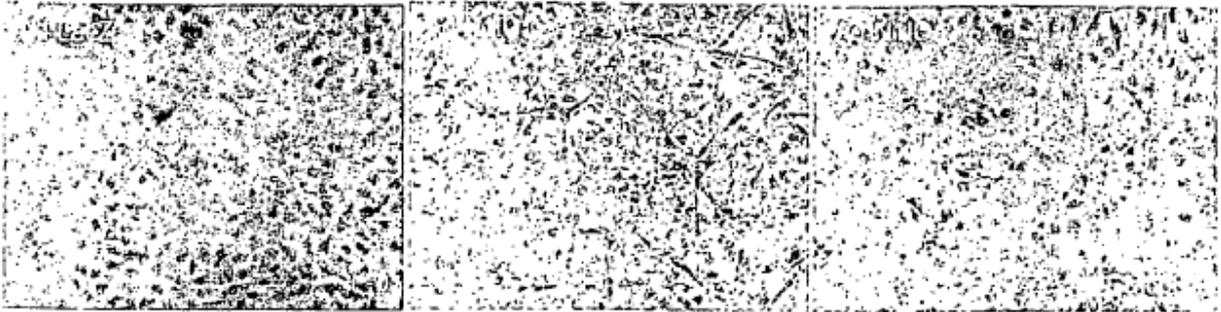


Figura 31B

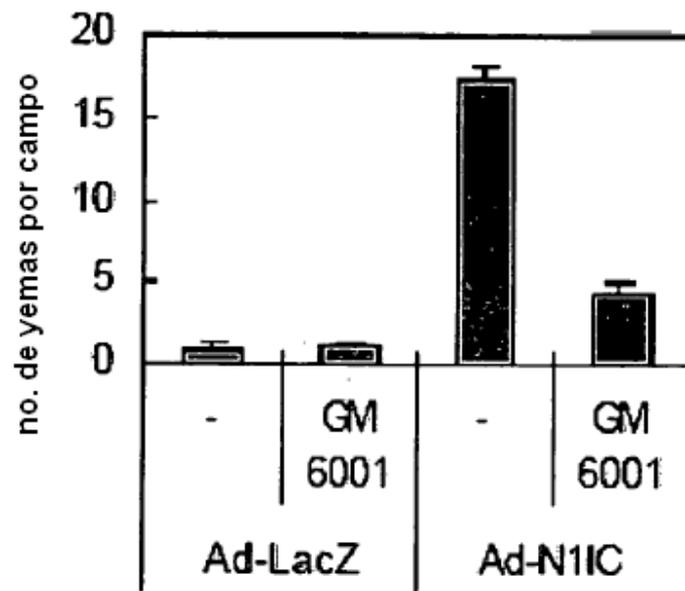


Figura 32A

1 atgggggcccgg gggcccgtgg ccgcccgcgc cgccgtcgcc cgatgtcgcc gccaccgcca  
 61 ccgccacccg tgcgggcgct gccctgctg ctgctgctag cggggccggg ggctgcagcc  
 121 cccccttggc tggacggaag cccgtgtgca aatggaggtc gttgcacca gctgccctcc  
 181 cgggaggctg cctgcctgtg cccgcctggc tgggtgggtg agcgggtgca gctggaggac  
 241 cctgtcact caggcccctg tgctggccgt ggtgtctgcc agagttcagt ggtggctggc  
 301 accgcccgat tctcatgccg tgccccccgt ggcttccgag gccctgactg ctccctgcca  
 361 gatccctgcc tcagcagccc ttgtgccac ggtgcccgt gctcagtggg gcccgatgga  
 421 cgcttctct gctcctgccc acctggctac cagggccgca gctgccgaag cgacgtggat  
 481 gagtgcggg tgggtgagcc ctgccgccat ggtggcacct gcctcaacac acctggctcc  
 541 ttccgctgcc agtgtccagc tggctacaca gggccactat gtgagaacct cgcggtgcc  
 601 tgtgcgccct caccatgccg taacgggggc acctgcaggc agagtggcga cctcacttac  
 661 gactgtgect gtcttctctg gtttgagggt cagaattgtg aagtgaacgt ggacgactgt  
 721 ccaggacacc gatgtctcaa tggggggaca tgcgtggatg gcgtcaacac ctataactgc  
 781 cagtgcctc ctgagtggac aggccagttc tgcacggagg acgtggatga gtgtcagctg  
 841 cagcccaacg cctgccaca tgggggtacc tgcttcaaca cgctgggtgg ccacagctgc  
 901 gtgtgtgtca atggctggac aggcgagagc tgcagtcaaga atatcgatga ctgtgccaca  
 961 gccgtgtgct tccatggggc cacctgccat gaccgcgtgg ctcttttcta ctgtgectgc  
 1021 ccatgggca agactggcct cctgtgtcac ctggatgacg cctgtgtcag caaccctgc  
 1081 cacgaggatg ctatctgtga cacaatccg tggaacggcc gggccatttg cacctgtect  
 1141 cccggcttca cgggtggggc atgtgaccag gatgtggacg agtgctctat cggcgccaac  
 1201 cctgcgagc acttgggcag gtgcgtgaac acgcagggt ccttctctgt ccagtgcggt  
 1261 cgtggctaca ctggacctcg ctgtgagacc gatgtcaacg agtgtctgtc ggggccctgc  
 1321 cgaaaccagg ccacgtgct cgaccgata ggccagttca cctgtatctg tatggcaggc  
 1381 ttcacaggaa cctattgca ggtggacatt gacgagtgtc agagtgcgcc ctgtgtcaac  
 1441 ggtggggtct gcaaggaccg agtcaatggc ttcagtgtca cctgccctc gggcttcagc  
 1501 ggctccacgt gtcagtgtga cgtggacgaa tgcgccagca cgcctgcag gaatggcgc  
 1561 aatgtcgtgg accagcccga tggctacgag tgccgctgtg ccgagggctt tgagggcacg  
 1621 ctgtgtgatc gcaacgtgga cgactgtcc cctgacccat gccaccatgg tcgctgcgtg  
 1681 gatggcatcg ccagcttctc atgtgctgt gctcctggct acacgggac acgctgcgag  
 1741 agccagggtg acgaatgccg cagccagccc tgcgccatg gcggcaaatg cctagacctg  
 1801 gtggacaagt acctctgccg ctgcccttct gggaccacag gtgtgaactg cgaagtgaac  
 1861 attgacgact tgcccagcaa cccctgcacc tttggagtct gccgtgatgg catcaaccgc  
 1921 tacgactgtg tctgccaacc tggcttcaaca gggcccctt gtaacgtgga gatcaatgag  
 1981 tgtgcttcca gcccatgcgg cgagggagggt tcctgtgtgg atgggaaaaa tggcttcgpc  
 2041 tgctctgccc cgcctggctc ctgccccca ctctgcctcc cccgagcca tcctgtgccc  
 2101 catgagcctt gcagtcacgg catctgctat gatgcacctg gcgggttccg ctgtgtgtgt  
 2161 gagcctggct ggagtgccc ccgctgcagc cagagcctgg cccgagacgc ctgtgagtcc  
 2221 cagccgtgca gggccggtgg gacatgcagc agcgatgga tgggtttcca ctgcacctgc  
 2281 ccgctggtg tccagggacg tcagtgtgaa ctctctccc cctgcacccc gaaccctgt  
 2341 gagcatgggg gccgctgcga gtctgccctt ggccagctgc ctgtctgtc ctgccccag  
 2401 ggctggcaag gccacgatg ccagcaggat gtggacgagt gtgctggccc cgcacctgt  
 2461 ggccctcatg gtatctgcac caacctggca gggagtttca gctgcacctg ccatggaggg  
 2521 tacactggcc ctctctgtga tcaggacatc aatgactgtg accccaacct atgctgaac  
 2581 ggtggtcgt gccaaagacg cgtgggtccc ttttctgct cctgctccc tggtttcgccc  
 2641 ggcccacgat gcgcccgcga tgtggatgag tgctgagca accctgcgg cccgggcacc

Figura 32B

2701 tgtaccgacc acgtggcctc cttcacctgc acctgcccgc caggctacgg aggcttccac  
 2761 tgcgaacagg acctgcccga ctgcagcccc agctcctgct tcaatggcgg gacctgtgtg  
 2821 gacggcgtga actcgttcag ctgcctgtgc cgtcccggct acacaggagc ccactgccaa  
 2881 catgaggcag acccctgcct ctgcgggcc cgtcctacacg ggggcgtctg cagcgcgcc  
 2941 caccctggct tccgctgcac ctgcctcag agcttcacgg gcccgcagtg ccagacgctg  
 3001 gtggattggt gcagccgcca gccttqtcaa aacgggggtc gctgcgtcca gactggggcc  
 3061 tattgccttt gtccccctgg atggagcggg cgcctctgtg acatccgaag cttgcctgc  
 3121 agggaggccg cagcccagat cgggggtcgg ctggagcagc tgtgtcaggc gggtagccag  
 3181 tgtgtggatg aagacagctc ccaactactgc gtgtgcccag agggccgtac tggtagccac  
 3241 tgtgagcagg aggtggacce ctgcttggcc cagccctgcc agcatggggg gacctgccgt  
 3301 ggctatatgg ggggctacat gtgtgagtgt cttoctggct acaatggtga taactgtgag  
 3361 gacgacgtgg acgagtgtgc ctcccagccc tgcagcacg ggggttcatg cattgacctc  
 3421 gtggcccgtc atctctgtc ctgtccccc ggaacgctgg ggggtctctg cgagattaat  
 3481 gaggatgact gcggcccagg cccaccgctg gactcagggc cccggtgcct acacaatggc  
 3541 acctgcgtgg acctggtggg tggtttcgc tgcacctgtc cccaggata cactggttg  
 3601 cgctgcgagg cagacatcaa tgagtgtgc tcagggtgct gccacgcggc acacaccgg  
 3661 gactgcctgc aggaccagc cggaggttc cgttgccttt gtcagtctgg cttctcaggt  
 3721 cctcgtgtc agactgtcct gtctccctgc gagtcccagc catgccagca tggaggccag  
 3781 tgccgtccta gccgggtcc tgggggtgg ctgacctca cctgtactg tgcccagccg  
 3841 ttctggggtc cgcgttgca gcgggtggc cgtcctgcc gggagctga gtgcccgggtg  
 3901 ggcgtcccat gccagcagc gcccccggg ccgcgtgcg cctgcccccc agggttgtcg  
 3961 ggacctcct gccgcagctt cccggggtcg ccgcccgggg ccagcaacgc cagctgcgcg  
 4021 gccgccccct gtctccacgg gggctcctgc cgcgccgcg cgtcgcgccc cttcttcgc  
 4081 tgcgcttgcg cgcagggctg gaccgggcc cgtgcgagg cgcgccgcg ggcaccgag  
 4141 gtctcggagg agccgcggtg cccgcgcgc gcctgccagg ccaagcgcgg ggaccagcgc  
 4201 tgcgaccgcg agtgcaacag cccaggtgc ggctgggacg gcggcgactg ctcgtgagc  
 4261 gtgggcgacc cctggcggca atgcgaggcg ctgcagtgtt ggcgcctctt caacaacagc  
 4321 cgctgcgacc ccgctgcag ctgcgccgc tgcctctacg acaacttga ctgccagcc  
 4381 ggtggccgcg agcgcacttg caaccgggtg tacgagaagt actgcgccga ccactttgcc  
 4441 gacggccgct gcgaccagg ctgcaacacg gaggagtgcg gctgggatgg gctggattgt  
 4501 gccagcgagg tgccggcct gctggcccgc ggcgtgctgg tgctcacagt gctgctgccg  
 4561 ccagaggagc tactgcgtt cagcgcgcac tttctgcagc ggctcagcgc catcctgcgc  
 4621 acctcgtgc gcttcgctt ggacgcgcac ggccaggcca tggctctccc ttaccaccgg  
 4681 cctagtctg gctccgaacc cggggccgt cgggagctgg cccccaggt gatcggctcg  
 4741 gtagtaatgc tggagattga caaccggctc tgcctgcagt cgcctgagaa tgatcactgc  
 4801 ttccccgatg cccagagcgc cgtgactac ctgggagcgt tgtcagcggg ggagcgcctg  
 4861 gacttcccgt acccaactgc ggcgtgcgg ggggagccgc tggagcctcc agaaccagc  
 4921 gtcccgtgc tgccactgct agtggcgggc gctgtctgc tctggtcat tctcgtcctg  
 4981 ggtgtcatgg tggcccggcg caagcgcgag cacagcacc tctggtccc tgaggcttc  
 5041 tactgcaca aggacgtggc ctctggtcac aagggccggc ggaaccctg gggccaggac  
 5101 gcgctgggca tgaagaacat ggccaagggt gagagcctga tgggggaggt ggccacagac  
 5161 tggatggaca cagagtgcct agaggccaag cggctaaagg tagaggagcc aggcattggg  
 5221 gctgaggagg ctgtggattg ccgtcagtgg actcaacacc atctggttgc tctgacatc  
 5281 cgcgtggcac cagccatggc actgacacca ccacagggcg acgcagatgc tgatggcatg  
 5341 gatgtcaatg tgcgtggccc agatggcttc accccgctaa tgctggcttc cttctgtggg  
 5401 ggggctctgg agccaatgcc aactgaagag gatgaggcag atgacacatc agctagcatc  
 5461 atctccgacc tgatctgcca gggggctcag ctggggcac ggactgaccg tactggcgag  
 5521 actgctttgc acctggctgc ccgttatgcc cgtgctgatg cagccaagcg gctgctggat

## Figura 32C

```

5581 gctggggcag acaccaatgc ccaggaccac tcaggccgca ctcccctgca cacagctgtc
5641 acagccgatg cccaggggtgt cttccagatt ctcatccgaa accgctctac agacttggat
5701 gcccgcgatg cagatggctc aacggcactg atcctggcgg cccgcctggc agtagagggc
5761 atggtggaag agctcatcgc cagccatgct gatgtcaatg ctgtggatga gcttgggaaa
5821 tcagccttac actgggctgc ggctgtgaac aacgtggaag ccactttggc cctgctcaaa
5881 aatggagcca ataaggacat gcaggatagc aaggaggaga cccccctatt cctggccgcc
5941 cgcgagggca gctatgaggc tgccaagctg ctggtggacc actttgccaa ccgtgagatc
6001 accgaccacc tggacaggct gccgcgggac gtagcccagg agagactgca ccaggacatc
6061 gtgcgcttgc tggatcaacc cagtgggccc cgcagccccc ccggtcccca cggcctgggg
6121 cctctgctct gtcctccagg ggccttctc cctggcctca aagcggcaca gtcgggggtc
6181 aagaagagca ggaggcccc cgggaaggcg gggctggggc cgcaggggcc ccgggggchg
6241 ggcaagaagc tgacgctggc ctgcccgggc ccctggctg acagctcggg cacgctgtcg
6301 cccgtggact cgtggactc cccgcggcct ttccgtgggc ccctgcttc ccctggggc
6361 ttcccccttg aggggcctta tgcagctgcc actgccactg cagtgtctct ggcacagctt
6421 ggtggcccag gccggggggg tctagggcgc cagccccctg gaggatgtgt actcagcctg
6481 ggcctgctga accctgtggc tgtgccctc gattgggccc ggctgcccc acctgcccct
6541 ccaggcccc cgttctctgt gccactggcg cggggacccc agctgctcaa ccaggggacc
6601 cccgtctccc cgcaggagcg gccccgcct tacctggcag tcccaggaca tggcgaggag
6661 taccggcgcg ctggggcaca cagcagcccc ccaaaggccc gcttctctcg ggttcccagt
6721 gagcaccctt acctgacccc atccccgaa tcccctgagc actggggcag ccctcacct
6781 cctccctct cagactggtc cgaatccacg cctagcccag ccactgccac tggggccatg
6841 gccaccacca ctggggcact gcctgcccag ccacttcctt tgtctgttcc cagctccctt
6901 gctcaggccc agaccagct ggggccccag ccggaagtac cccaagag gcaagtgtg
6961 gcc

```

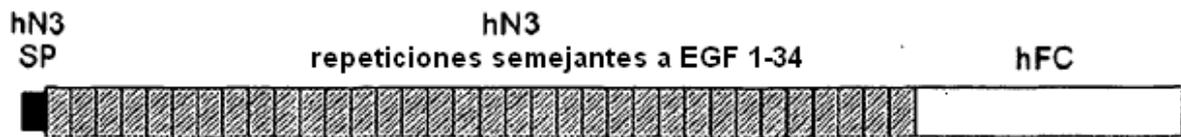
Figura 33

MGPARGRRRRRRPMSPPPPPPVRLPLLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQLPSREAAACLPPGWVGE  
 RCQLEDPCHSGPCAGRVCQSSVAGTARFSCRCPRGFRGPDCLPDPCLSSPCAHGARCSVGPDRFLCSCPP  
 GYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHHGTCLNTPGSFRCQC PAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCTRQSGDLTYDC  
 ACLPGFEGQNCENVVDDCPGHRCLNNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDEQCQLQPNACHNGGTCFNTLG  
 GHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPMGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNP  
 VNGRAICTC PPGFTGGACDQDVDECSIGANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRQA  
 TCLDRIGQFTCICMAGFTGTyceVDIDEQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCCTCPSGFSGSTCQLDVDECASTPCR  
 N GAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCDRNVDDCS PDPCHHGRCVDGIASFSCACAPGYTGTRCESQVDECRSQPCR  
 HGGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCEVNIDDCASNPC TFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPC  
 GEGGSCVDGENGFRCLCPPGSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACES  
 QPCRAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPOGWQGPCQDQVDEC  
 AGPAPCGPHGICTNLAGSFSCTCHGGYTGPSCDQDINDCPNCLNNGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDV  
 DECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPGYGGFHCEQDL PDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHE  
 ADPCLSRPCLHGGVCSAAHPGRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGWSGRLCDIR  
 SLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDESSHYCVCPEGRTGSHCEQEVDPCLAQPCQHGGTCRGMGGYMCEC  
 LPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSCIDLVARYLCSCPPGTLGVLC EINEDDCGPGPLDSGPRCLHNGTCVD  
 LVGGFRCTCPPGYTGLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHG  
 GQCRPSPGPGGLTFTCHCAQPFWGPCRVARSCRELQCFVGVPCQQT PRGPRCACPPGLSGPSCRSPGSP  
 GASNASCAAAPCLHGGSCRPAPLAPFFRCACAQGTGPRCEAPAAAPEVSEEPRCPRAACQAKRGDQRCDECN  
 SPGCGWDGDCSLSVGDPWRQCEALQCWRLFNNRCDPACSSPAclyDNFDCHAGGRERTCNPVYEKCADHFA  
 DGRCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRTSLRFRDLAHDGQAM  
 VFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQS PENHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRD  
 VRGEPEPPEPSVPLLPLLVAGAVLLLVILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDAL  
 GMKNMAKGESLMGEVATDWMDETCPEAKRLKVEEPGMGAEEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPAMALTPPQGDAD  
 ADGMDVNVRGPDGFTPLMLASFCGGALEPMPTEEDEADTSAS IISDLICQGAQLGARTDRTGETALHLAARYA  
 RADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRTPHHTAVTADAQGVFQILIRNRSTDL DARMADGSTALILAAARLAVEGMVEE  
 LIASHADVNAVDELGKSALHWAAAVNNVEATLALLKNGANKMDQSKETPLFLAAREGSYEAALLLDHFANR  
 EITDHLDRLPRDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPGAFPLPGLKAAQSGSKSRPPGKAGL  
 GPQGPRGRGKLTACPGPLADSVTLSPVDSLDSRPFPGPPASPGGFPLEGPYAAATATAVSLAQLGGPGRA  
 GLGRQPPGGCVLSLGLLPVAVPLDWARLPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTPVSPQERPPPYLAVPGHGEE  
 YPAAGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPSPPSLDWESESTPSPATATGAMATTTGALPAQPLPL  
 SVPSSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA

Figura 34

### Señuelos Notch3 Humanos

señuelo h-Notch3<sup>(1-34)</sup>



señuelo h-sp<sup>HC</sup>Notch3<sup>(1-34)</sup>

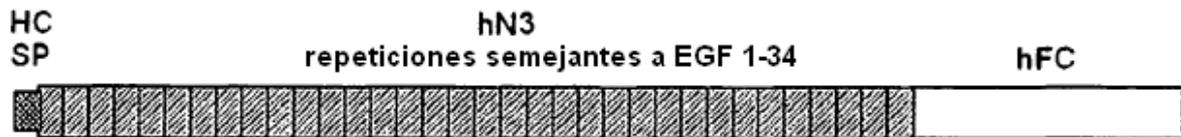


Figura 35

```

                                gatct gggcccgggc
781 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg
841 gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg
901 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
961 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
1021 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccctcc tgcaccagga ctggctgaat
1081 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1141 atctcaaag ccaaggga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg
1201 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1261 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct
1321 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1381 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1441 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga

```

**Figura 36**

DLGPGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 37

**Señuelo Notch3 humano (EGF-LR 1-34)**

N3 humano

gag gag ccg cgg (SEQ ID NO:19)  
 ctc ctc ggc gcc (SEQ ID NO:20)  
 E E P R (SEQ ID NO:21)

Añadir sitio Bg1II cambio último nucleótido

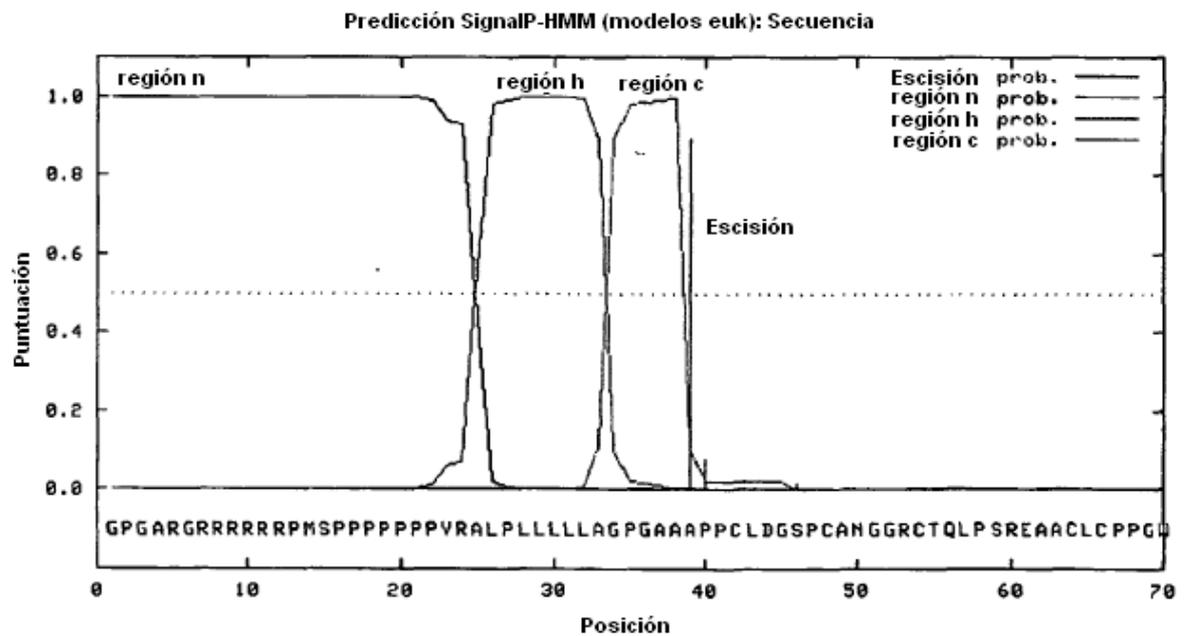
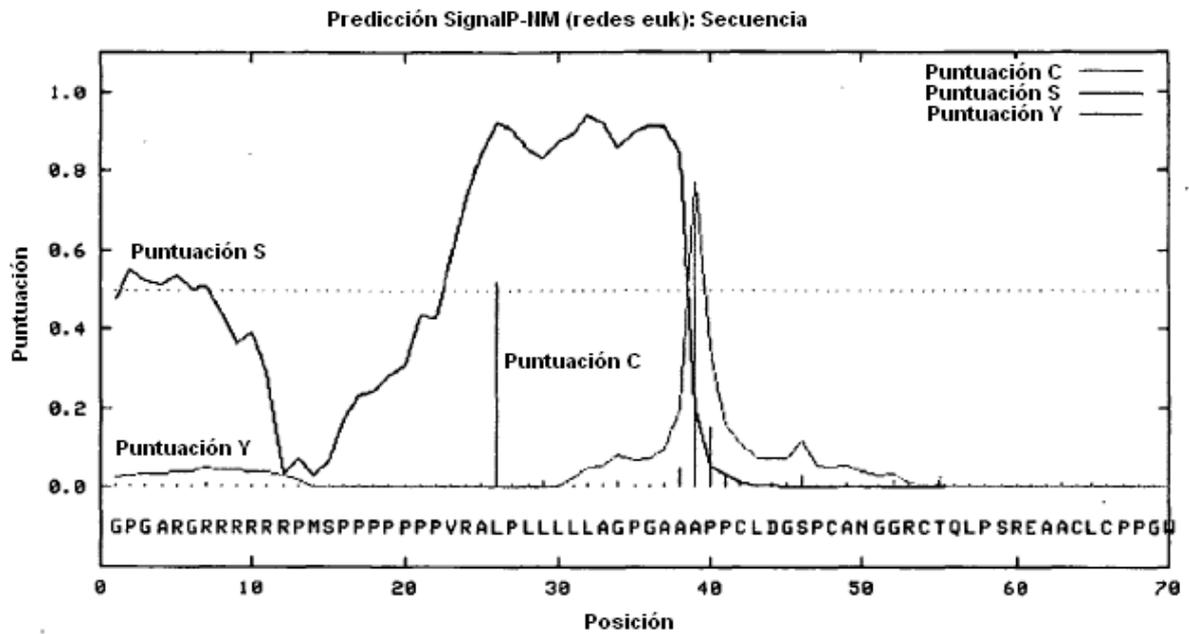
gag gag ccg cga **GAT CT** (SEQ ID NO:22)  
 ctc ctc ggc gct **CTA GA** (SEQ ID NO:23)  
 E E P R (SEQ ID NO:21)

Fusión N3/FC

gag gag ccg cga GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO:24)  
 ctc ctc ggc gct CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO:25)  
 E E P R D L G P (SEQ ID NO:26)

Figura 38

### Péptido Señal de Notch3 Humano

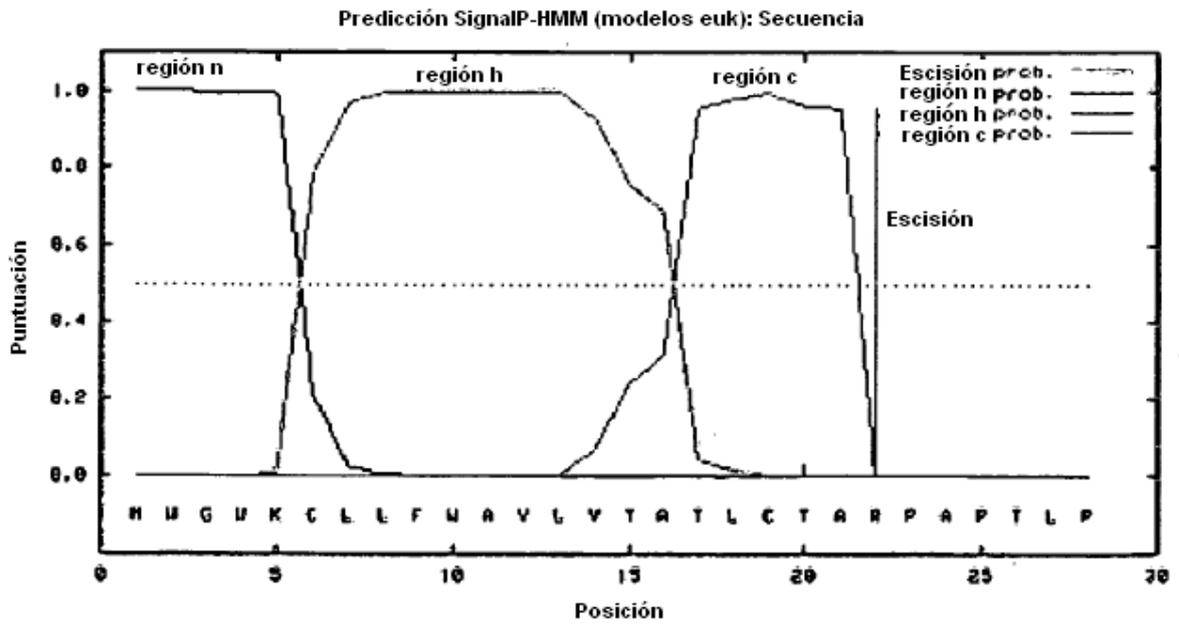
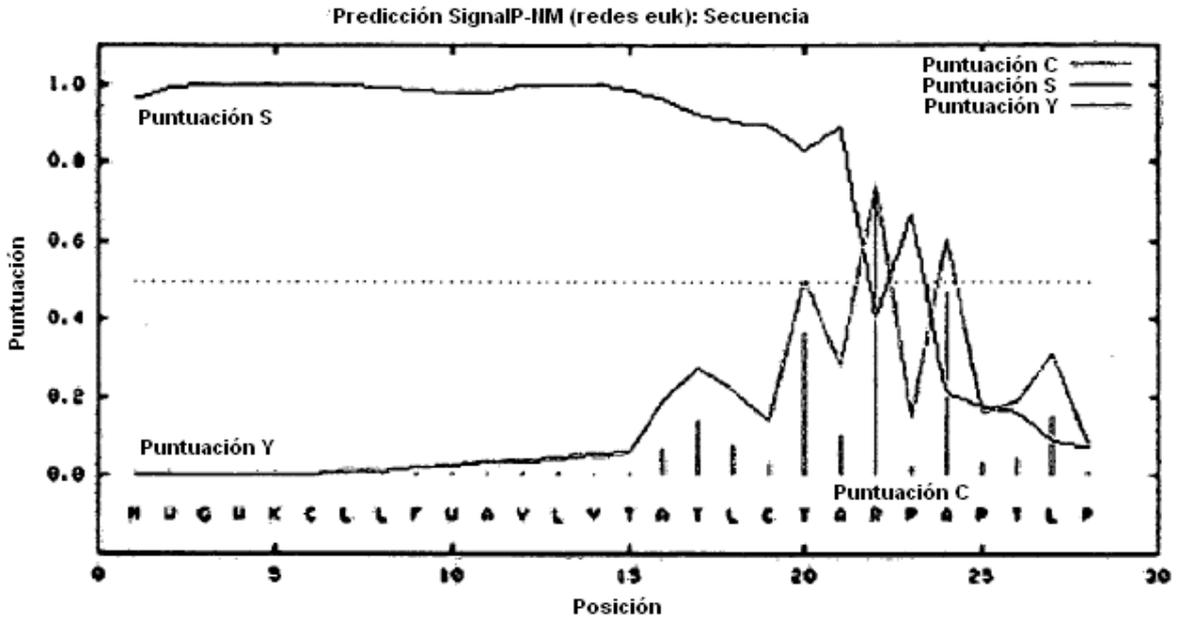


**MGPGARGRRRRRRPMSPPPPPPVRLPLLLLLAGPGA/A (SEQ ID NO**

1 atggggccgg gggcccgtag cgcgcgcgc gcgcgtagcc cgatgtagcc gccaccgcca cgcaccgg  
tgcggcgct gccctgctg ctgctgtag cggggccgg ggcgca/gcc 120 (SEQ ID NO:28)

Figura 39

**Péptido Señal HC Humano**



**MWGWKCLLFWAVLVTATLCTA/R (SEQ ID NO:29)**

1 atgtggggct ggaagtgcct cctcttctgg gctgtgctgg tcacagccac tctctgcact gccagg 66

Figura 40A

1 atggggcccg gggcccgtgg ccgcccccgc cgccgtcgcc cgatgtcgcc gccaccgcca  
 61 ccgccacccg tgcgggcegt gccctgctg ctgctgctag cggggccggg ggctgcagcc  
 121 ccccttggc tggacggaag cccgtgtgca aatggaggtc gttgcacca gctgccctcc  
 181 cgggaggctg cctgectgtg cccgcctggc tgggtgggtg agcgggtgtca gctggaggac  
 241 ccctgtcact caggcccctg tgctggccgt ggtgtctgcc agagttcagt ggtggctggc  
 301 accgcccgat tctcatgccg gtgccccctg ggcttccgag gccctgactg ctccctgcca  
 361 gatccctgce tcagcagccc ttgtgcccac ggtgcccgtc gctcagtggg gcccgatgga  
 421 cgcttctctc gctectgccc acctggctac cagggccgca gctgccgaag cgacgtggat  
 481 gagtgcgggg tgggtgagcc ctgccgccat ggtggcacct gcctcaacac acctggctcc  
 541 tccgctgccc agtgtccagc tggctacaca gggccactat gtgagaacct cgcggtgccc  
 601 tgtgcgccct caccatgccg taacgggggc acctgcaggc agagtggcga cctcacttac  
 661 gactgtgect gtcttctctg gtttgagggt cagaattgtg aagtgaacgt ggacgactgt  
 721 ccaggacacc gatgtctcaa tggggggaca tgcgtggatg gcgtcaacac ctataactgc  
 781 cagtgccttc ctgagtggac aggccagttc tgcacggagg acgtggatga gtgtcagctg  
 841 cagcccaacg cctgccacaa tgggggtacc tgcttcaaca cgtgggtgg ccacagctgc  
 901 gtgtgtgtca atggctggac aggcgagagc tgcagtcaga atatcgatga ctgtgccaca  
 961 gccgtgtgct tccatggggc cacctgccat gaccgcgtgg cttctttcta ctgtgectgc  
 1021 cccatgggca agactggcct cctgtgtcac ctggatgacg cctgtgtcag caaccctgc  
 1081 cacgaggatg ctatctgtga cacaaatccg gtgaacggcc gggccatttg cacctgtcct  
 1141 cccgcttca cgggtggggc atgtgaccag gatgtggacg agtgtctat cggcgccaac  
 1201 ccctgcgagc acttgggcag gtgctgaaac acgcagggtc ccttctctgt ccagtgcggt  
 1261 cgtggctaca ctggacctcg ctgtgagacc gatgtcaacg agtgtctgtc ggggccctgc  
 1321 cgaaaccagg ccacgtgcct cgaccgcata ggccagttca cctgtatctg tatggcaggc  
 1381 ttcacaggaa cctattgcga ggtggacatt gacgagtgtc agagttagccc ctgtgtcaac  
 1441 ggtgggtctc gcaaggaccg agtcaatggc ttcagctgca cctgcccctc gggcttcagc  
 1501 ggctccacgt gtcagctgga cgtggacgaa tgcgccagca cgccctgcag gaatggcgcc  
 1561 aaatgcgtgg accagcccga tggctacgag tgcgctgtg ccgagggctt tgagggcacg  
 1621 ctgtgtgatc gcaacgtgga cgactgctcc cctgacccat gccaccatgg tcgctgcgtg  
 1681 gatggcatcg ccagcttctc atgtgectgt gctcctggtc acacgggcac acgctgcgag  
 1741 agccagggtg acgaatgccg cagccagccc tgcgccatg gcggcaaatg cctagacctg  
 1801 gtggacaagt acctctgccg ctgcccttct gggaccacag gtgtgaactg cgaagtgaac  
 1861 attgacgact gtgccagcaa cccctgcacc tttggagtct gccgtgatgg catcaaccgc  
 1921 tacgactgtg tctgccaaac tggcttcaca gggccccttt gtaacgtgga gatcaatgag  
 1981 tgtgcttcca gcccatgcgg cgagggagggt tectgtgtgg atggggaaaa tggcttccgc  
 2041 tgcctctgce cgectggetc cttgccccca ctctgectcc ccccgagcca tcctgtgccc  
 2101 catgagccct gcagtcacgg catctgctat gatgcacctg gcgggttccg ctgtgtgtgt  
 2161 gagcctggct ggagtggccc ccgctgcagc cagagcctgg cccgagagcc ctgtgagtcc  
 2221 cagccgtgca gggccggtgg gacatgcagc agcgatggaa tgggtttcca ctgcaacctgc  
 2281 ccgcttgggtg tccagggacg tcagtgtgaa ctctctccc cctgaccccc gaaccctgt  
 2341 gagcatgggg gccgctgcga gtctgcccct ggccagctgc ctgtctgctc ctgccccag  
 2401 ggctggcaag gccacgatg ccagcaggat gtggacgagt gtgctggccc cgcacctgt  
 2461 ggccctcatg gtatctgcac caacctggca gggagtttca gctgcacctg ccatggaggg  
 2521 tacactggcc ctctctgtga tcaggacatc aatgactgtg accccaacct atgctgaac  
 2581 ggtggctcgt gccaaagcgg cgtgggctcc ttttctctgt cctgectccc tggtttegcc  
 2641 ggcccacgat gcgcccgcga tgtggatgag tgctgagca accctgccc cccgggcacc  
 2701 tgtaccgacc acgtggcttc ctacacctgc acctgcccgc caggctacgg aggcttccac  
 2761 tgcgaacagg acctgcccga ctgcagcccc agctcctgct tcaatggcgg gacctgtgtg

Figura 40B

2821 gacggcgtga actcgttcag ctgcctgtgc cgtcccggct acacaggagc ccaactgccaa  
 2881 catgaggcag acccctgcct ctcgcgggccc tgcctacacg ggggcgtctg cagcgcgcgc  
 2941 caccctggct tccgctgcac ctgcctcgag agcttcacgg gcccgcagtg ccagacgctg  
 3001 gtggattggt gcagccgcca gccttgteaa aacggggggtc gctgcgtcca gactgggggc  
 3061 tattgccttt gtecccctgg atggagcgga cgcctctgtg acatccgaag cttgcccctgc  
 3121 agggaggccg cagcccagat cgggggtgcgg ctggagcagc tgtgtcaggc ggggtggcag  
 3181 tgtgtggatg aagacagctc ccactactgc gtgtgcccag agggccgtac tggtagccac  
 3241 tgtgagcagg aggtggacce ctgcttggcc cagccctgcc agcatggggg gacctgccgt  
 3301 ggctatatgg ggggctacat gtgtgagtgt ctccctggct acaatgggta taactgtgag  
 3361 gacgacgtgg acgagtgtgc ctcccagccc tgccagcacg ggggttcacg cattgacctc  
 3421 gtggcccgcct atctctgctc ctgtccccc a ggaacgctgg ggggtgctctg cgagattaat  
 3481 gaggatgact gcggcccagg cccaccgctg gactcagggc cccgggtgcct acacaatggc  
 3541 acctgcgtgg acctgggtggg tgggttccgc tgcacctgtc ccccaggata cactgggttg  
 3601 cgctgcgagg cagacatcaa tgagtgtcgc tcaggtgcct gccacgcggc acacaccgcg  
 3661 gactgcctgc aggaccagc cggaggttcc cgttgccctt gtcattgctg cttctcaggt  
 3721 cctcgctgtc agactgtcct gtctccctgc gactcccagc catgccagca tggaggccag  
 3781 tgccgtccta gcccggtcc tgggggtggg ctgaccttca cctgtcactg tcccagccg  
 3841 ttctggggtc cgcggtgcga gcgggtggcg cgtccctgcc gggagctgca gtgcccggtg  
 3901 ggcgtcccat gccagcagac gccccgcggg ccgcgctgcg cctgcccccc agggttgtcg  
 3961 ggaccctect gccgcagctt cccggggtcg ccgcccgggg ccagcaacgc cagctgcgcg  
 4021 gccgccccct gtctccacgg gggctcctgc cgcgccgcgc cgtcgcgcgc cttcttccgc  
 4081 tgcgcttgcg cgcagggctg gaccgggccc cgtgcgagg cgcgcgcgc ggcaccgcag  
 4141 gtctcggagg agccgcgaga tctgggcccc ggcgagccca aatcttgtga caaaactcac  
 4201 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc  
 4261 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg  
 4321 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg  
 4381 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc  
 4441 gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc  
 4501 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga  
 4561 gaaccacagg tqtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc  
 4621 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat  
 4681 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc  
 4741 ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca  
 4801 tgctccgtga tgcatgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct  
 4861 ccgggtaaat ga



Figura 42

MWGWKCLLFWAVLVTATLCTARPPCLDGS PCANGGRCTQLPSREAACLCPPGWVGERCQL  
EDPCHSGPCAGRGVCQSSVVAGTARF SCRCPRGFRGPDCSLPDPCLSSPCAHGARCSVGP  
DGRFLCSCP PGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPA  
VPCAPS PCRNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEGQNCENVVDDCPGHRCLNGGTCVDGVNTY  
NCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNACHNGGTCFNLTGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDC  
ATAVCFHGATCHDRVASFYCACPMGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICT  
CPPGFTGGACDQDVDECSIGANPCEHLGRVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSG  
PCRNQATCLDRIGQFTCICMAGFTGTyceVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSG  
FSGSTCQLDVDECASTPCRNGAKCVDQPDGYECRAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGR  
CVDGIASFSCACAPGYTGTRCESQVDECRSQPCRHGGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCE  
VNIDDCASNPECTFGVCRDGINRYDCVCPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENG  
FRCLCPPGSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDAC  
ESQPCRAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSC  
PQGWOQPRCQQDVDECAGPAPCGPHGICTNLAGSFSTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNPC  
LNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPGYGG  
FHCEQDLPDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCLHGGVCS  
AAHPGFRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGWSGRLCDIRSL  
PCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDEDESSHVCVCEGRTGSHCEQEVDPCLAQPCQHGGT  
CRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSCIDLVARYLCS CPPGTLGVLCE  
INEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYTGLRCEADINECRSGACHAAH  
TRDCLQDPGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHGGQCRPSPGGGGLTFTCHCA  
QPFWGPRCERVARSCRELQCPVGVPCQQT PRGPRCACPPGLSGPSCRSPGSPPGASNAS  
CAAAPCLHGGSCRPAPLAPFFRCACAQGTGPRCEAPAAAPEVSEPRDLGPGEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK -

Figura 43A

```

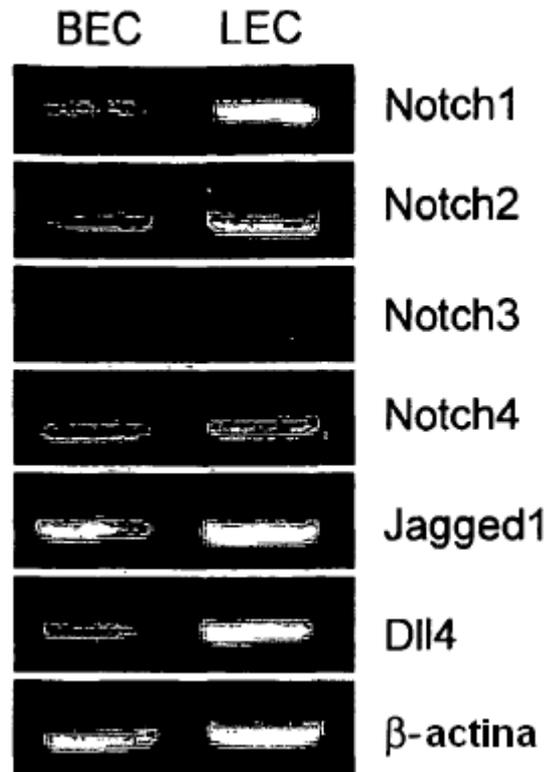
1  atgtggggct ggaagtgcct cctcttctgg gctgtgctgg tcacagccac tctctgcact
61  gccaggccac cttgcctgga cggaaagcccg tgtgcaaatag gaggtcgttg caccagctg
121 cctcccggg aggtgcctg cctgtgcccg cctggctggg tgggtgagcg gtgtcagctg
181 gaggaccct gtcactcagg cccctgtgct ggccgtggg tctgccagag tcagtggg
241 gctggcacc cccgattctc atgccggggtc ccccggtggc tccgaggccc tgaactgctc
301 ctgccagatc cctgcctcag cagccctgtt gcccacgggtg cccgctgctc agtggggccc
361 gatggacgt tctctgctc ctgcccacct ggtaccagg gccgcagctg ccgaagcgac
421 gtggatgagt gccgggtggg tgagccctgc cgcctgggtg gcacctgct caacacacct
481 ggctccttc gctgccagt tccagctggc tacacagggc cactatgtga gaaccccg
541 gtgcctgtg cgcctcacc atgccgtaac gggggcacct gcaggcagag tggcgacctc
601 acttacgact gtgcctgtct tctgggttt gagggtcaga attgtgaagt gaactgggac
661 gactgtccag gacaccgat tctcaatggg gggacatgcg tggatggcgt caacacctat
721 aactgccagt gccctcctga gtggacaggc cagtctgca cggaggcgt ggatgaggtg
781 cagctgcagc ccaacgctg ccacaatggg ggtacctgct tcaacacgct ggggtggccac
841 agctgcgtgt gtgtcaatgg ctggacaggc gagagctgca gtcagaatat cgatgactgt
901 gccacagccg tgtgcttcca tggggcccacc tgccatgacc gcgtggcttc tttctactgt
961 gcctgccccca tgggcaagac tggcctcctg tgtacctgg atgacgctg tgtcagcaac
1021 cctgccacg aggatgctat ctgtgacaca aatccgggtga acggccgggc catttgacc
1081 tgtcctccc gcttcacggg tggggcatgt gaccaggatg tggacgagtg ctctatcggc
1141 gccaacccct gcgagcactt gggcagggtg gtgaacacgc agggctcctt cctgtgccag
1201 tgoggtcgtg gctacactgg acctcgtgt gagaccgat tcaacgagtg tctgtcgggg
1261 cctgccgaa accaggcccac gtgcctcgac cgcataggcc agttcacctg tatctgtatg
1321 gcaggcttca caggaacctt ttgcgaggtg gacattgacg agtgtcagag tagccctgt
1381 gtcaacgggt gggctcgtcaa ggaccgagtc aatggcttca gctgcacctg cccctcgggc
1441 ttcagcggct ccacgtgtca gctggacgtg gacgaatgcg ccagcacgcc ctgcaggaat
1501 ggcgccaat gcgtggacca gcccgatggc tacgagtgcc gctgtgccga gggctttgag
1561 ggcacgctgt gtgatcgcaa cgtggacgac tgetcccctg acctatgcca ccatggtcgc
1621 tgcgtggatg gcatcgccag cttctcatgt gctgtgctc ctggtacac gggcacacgc
1681 tgcgagagcc aggtggacga atgccgcagc cagccctgcc gccatggcgg caaatgccta
1741 gacctggtgg acaagtaact ctgccgctgc cctctcggga ccacaggtgt gaactgcgaa
1801 gtgaacattg acgactgtgc cagcaacccc tgcaaccttg gactctgccc tgatggcatc
1861 aaccgctacg actgtgtctg ccaacctggc ttcacagggc cctttgtaa cgtggagatc
1921 aatgagtggt cttccagccc atgcccggag ggaggttctt gtgtggatgg ggaaaatggc
1981 tccgctgcc tctgcccgcc tggctccttg cccccactct gctcccccc gagccatccc
2041 tgtgcccctg agccctgcag tcacggcate tgetatgat cacctggcgg gttccgctgt
2101 gtgtgtgagc ctggctggag tggccccgc tgcagccaga gcctggccc agacgctgt
2161 gactcccagc cgtgcagggc cgggtgggaca tgcagcagcg atggaatggg tttccactgc
2221 acctgcccgc ctggtgtcca gggacgtcag tgtgaactcc tetccccctg cccccgaac
2281 cctgtgagc atgggggccc ctgcgagtct gccctggcc agctgctgt ctgctcctgc
2341 cccagggct ggcaaggccc acgatgccag caggatgtgg acgagtgtgc tggccccgca
2401 cctgtggcc ctcatggtat ctgcaccaac ctggcagggg gtttcagctg cacctgcat
2461 ggaggggtaca ctggcccttc ctgtgatcag gacatcaatg actgtgacct caacctatgc
2521 ctgaacgggtg gctcgtgcca agacggcgtg ggctccttt cctgctcctg cctcctcgtt
2581 ttcgcccggc cacgatgcgc ccgcatgtg gatgagtgcc tgagcaaccc ctgcccggc
2641 ggcacctgta ccgaccacgt ggcctccttc acctgcacct gccgcccagg ctacggaggc
2701 ttcactgcg aacaggacct gccgactgc agccccagct cctgctcaa tggcgggacc
2761 tgtgtggacg gcgtgaactc gttcagctgc ctgtgccgtc ccggtacac aggagcccac
2821 tgccaacatg aggcagaccc ctgcctctcg cggcctgcc tacacggggg cgtctgcagc

```

Figura 43B

2881 gccgcccacc ctggettccg ctgcacctgc ctcgagagct tcacgggccc gcagtgccag  
 2941 acgctggtgg attggtgcag ccgccagcct tgtcaaaacg ggggtcgtg cgtccagact  
 3001 ggggcctatt gcctttgtcc ccctggatgg agcggacgcc tctgtgacat ccgaagcttg  
 3061 ccctgcaggg aggccgcagc ccagatcggg gtgcggctgg agcagctgtg tcaggcgggt  
 3121 gggcagtgtg tggatgaaga cagctcccac tactgcgtgt gccagaggg cgtactggt  
 3181 agccactgtg agcaggaggt ggaccctgc ttggcccagc cctgccagca tggggggacc  
 3241 tgccgtggct atatgggggg ctacatgtgt gagtgtcttc ctggctacaa tggtgataac  
 3301 tgtgaggacg acgtggacga gtgtgcctcc cagccctgcc agcacggggg ttcattgatt  
 3361 gacctcgtgg cccgctatct ctgtcctgt cccccaggaa cgtcgggggt gctctgcgag  
 3421 attaattgagg atgactgcgg cccaggccca ccgctggact cagggccccg gtgcctacac  
 3481 aatggcacct gcgtggacct ggtgggtggt ttccgctgca cctgtcccc aggatacact  
 3541 ggtttgcgct gcgaggcaga catcaatgag tgcgctcag gtgcctgcca cgcggcacac  
 3601 acccgggact gcctgcagga cccaggcgga ggtttccgtt gcctttgtca tgcaggcttc  
 3661 tcaggtcctc gctgtcagac tgtcctgtct ccctgcgagt cccagccatg ccagcatgga  
 3721 ggccagtgcc gtccatagccc gggtcctggg ggtgggctga ccttcacctg tcaactgtgc  
 3781 cagccgttct ggggtccgcg ttgcgagcgg gtggcgcgct cctgccggga gctgcagtgc  
 3841 ccggtggggc tcccatgcca gcagacgcc cgcgggcgcg gctgcgctg cccccaggg  
 3901 ttgtcgggac cctcctgccc cagcttcccg gggtcgccc cggggggccag caacgccagc  
 3961 tgcgcggccg cccctgtct ccacgggggc tctcgcgccc ccgcgcgct cgcgccttc  
 4021 ttccgctgcg cttgcgcgca gggctggacc gggccgcgct gcgaggcgc ccgcgcgca  
 4081 cccgaggtct cggaggagcc gcgagatctg ggcccgggcg agcccaaatac ttgtgacaaa  
 4141 actcacacat gccaccgtg cccagcact gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc  
 4201 ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg  
 4261 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtca actggtacgt ggacggcgtg  
 4321 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg  
 4381 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag  
 4441 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag  
 4501 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag  
 4561 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgcctt ggagtgggag  
 4621 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc  
 4681 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc  
 4741 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc  
 4801 ctgtctccgg gtaaatga

Figura 44

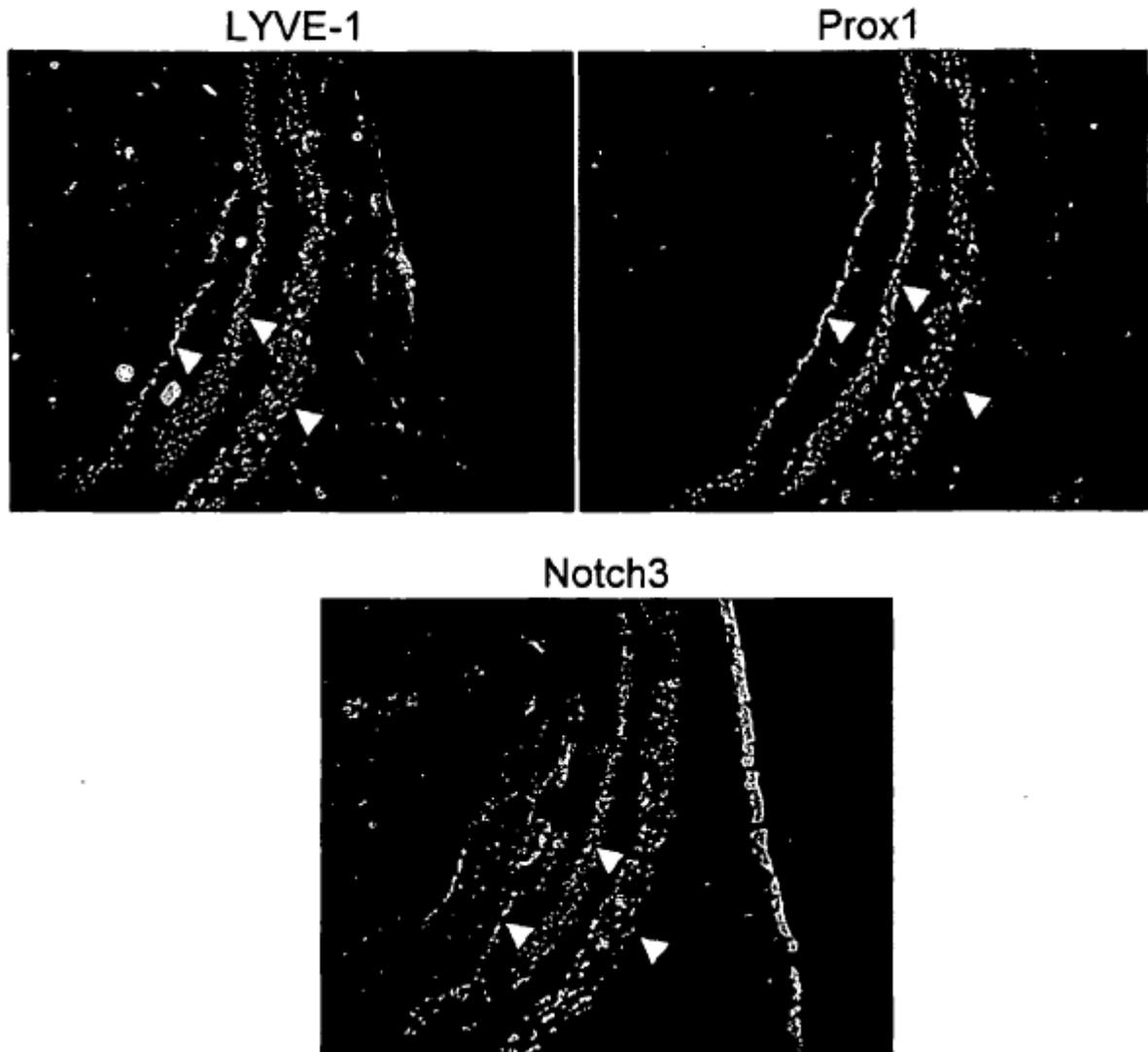


**Expresión de proteínas y ligandos Notch en células endoteliales sanguíneas y linfáticas.**

Se llevó a cabo RT-PCR para Notch1-4, Dll1, Dll4 y Jagged1 en ARN aislado de células endoteliales sanguíneas (BEC) y células endoteliales linfáticas (LEC) purificadas de HMVEC (Fig. 4A). Notch1, Notch2, Notch4, Dll4 y Jagged1 se expresaron tanto en BEC como LEC a un nivel similar. La expresión de Notch3 parece estar restringida a LEC lo que sugiere que la señalización de Notch3 funciona en el endotelio linfático.

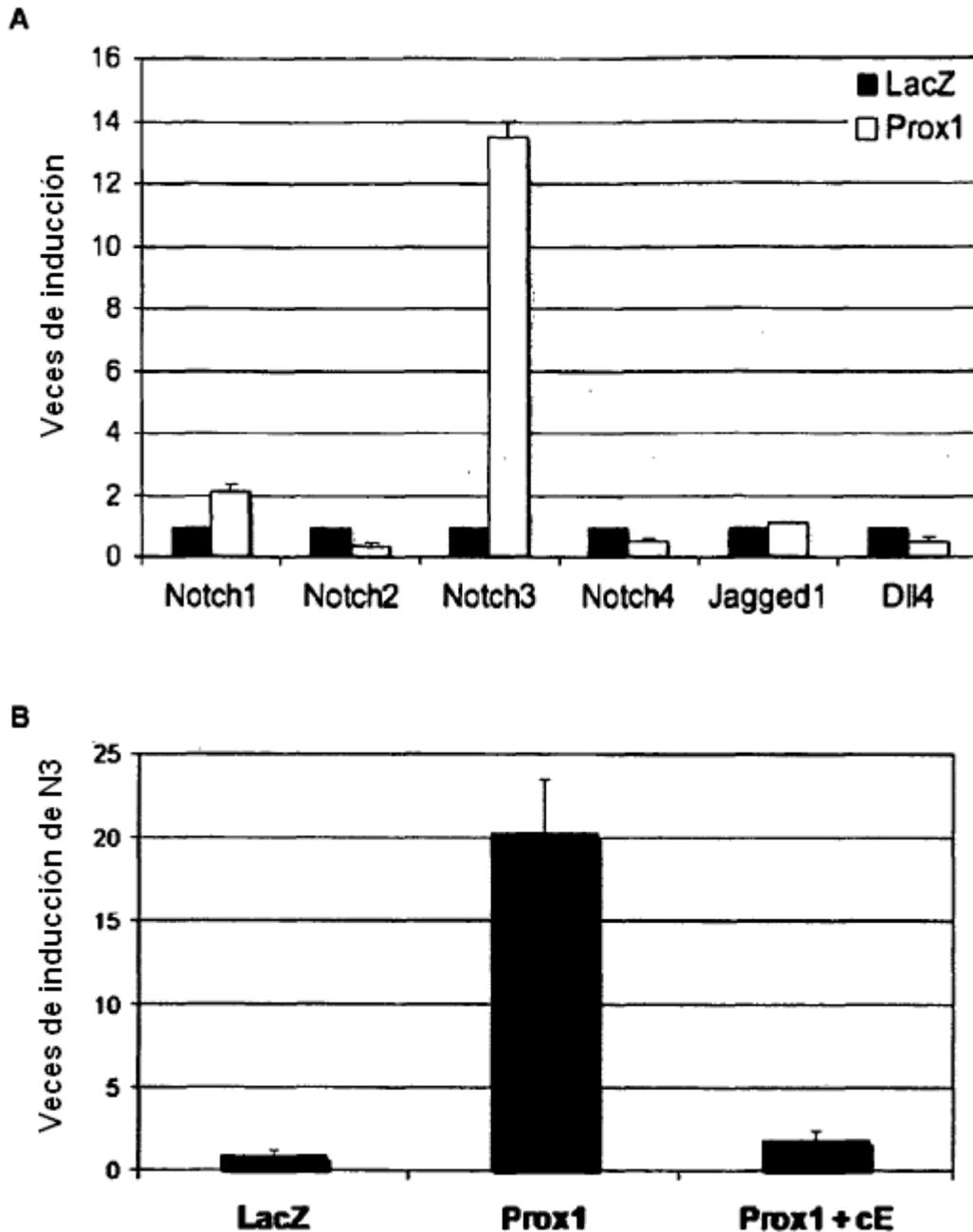
5

Figura 45



5 **Notch3 se co-expresa con los marcadores de células endoteliales linfáticas LYVE-1 y Prox1 en embriones e13.5.** Se inmunotifieron secciones seriadas de 10 micrómetros de embriones de ratón de 13.5 días embrionarios bien para LYVE-1, Prox1 y Notch3. Notch3 se expresaba en las células que también expresaban los marcadores de células endoteliales linfáticas, LYVE-1 y Prox1.

Figura 46

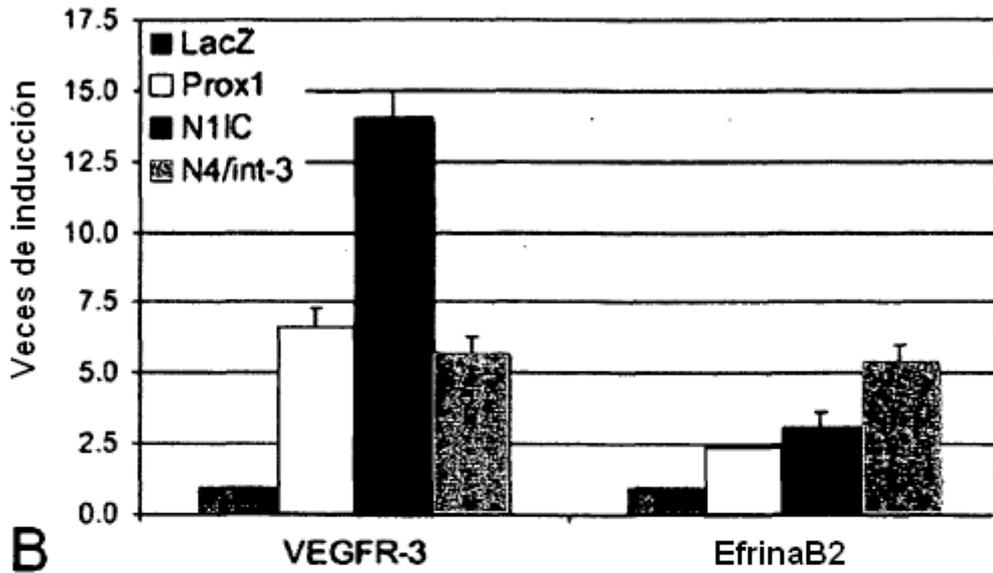


**Prox1 induce la expresión de Notch3 en células endoteliales sanguíneas.** **A.** Examinamos si la expresión ectópica de Prox1 alteraría la expresión de proteínas o ligandos Notch. Veinticuatro horas después de la infección adenoviral bien con Ad-Prox1 o Ad-LacZ, se aisló el ARN total de HUVEC y se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para Notch1-4, DII4 y Jagged1. Prox-1 reguló al alza de manera robusta la expresión de Notch3. La expresión de Notch1, Notch2, Notch4, DII4 y Jagged1 no se vio afectada significativamente. **B.** El Compuesto E (cE), inhibidor de presenilina que inhibe la señalización de Notch, se incubó durante 24 horas en HUVEC infectadas bien con Ad-LacZ o Ad-Prox1. Se aisló el ARN total y se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para determinar la expresión de Notch3. Prox1 indujo la expresión de Notch3 y esta inducción se inhibió por la adición del Compuesto E. Esto sugiere que la inducción por Prox1 de Notch3 depende de la activación de la señal Notch.

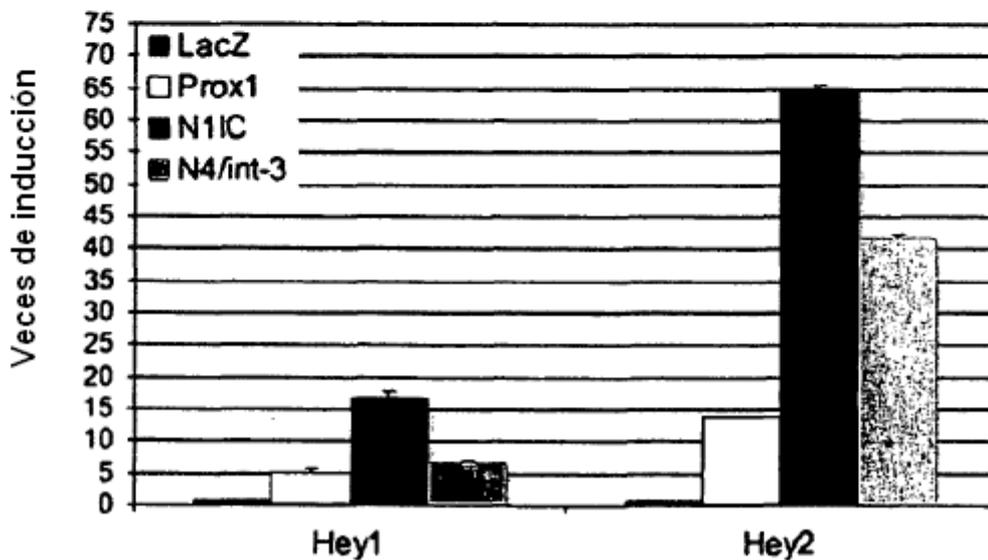
5  
10

Figura 47

A



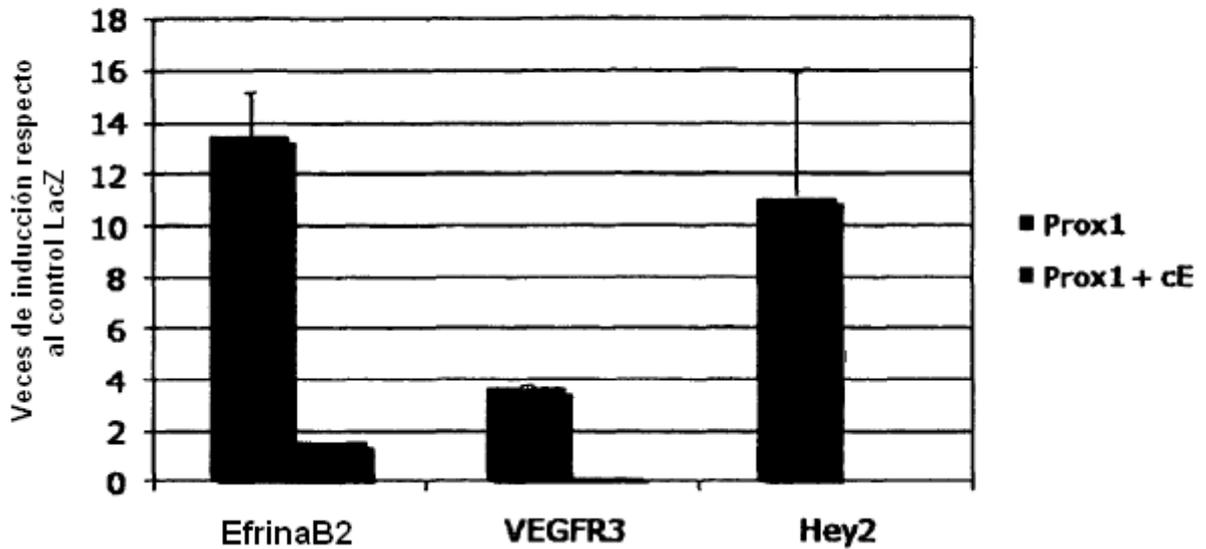
B



**Prox1 induce genes diana de Notch en células endoteliales sanguíneas.** Se infectaron HUVEC con adenovirus que codifican, LacZ, Prox1, N1IC o N4/int-3 y se aisló el ARN total 24 horas después de la infección. Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para los genes diana de Notch endoteliales, VEGFR-3, EfrinaB2, Hey1 y Hey2. De manera similar a la activación de la señal de Notch1 y Notch4, Prox1 indujo los cuatro genes (A y B). Se desconoce la expresión de Hey1 y Hey2 en el endotelio linfático.

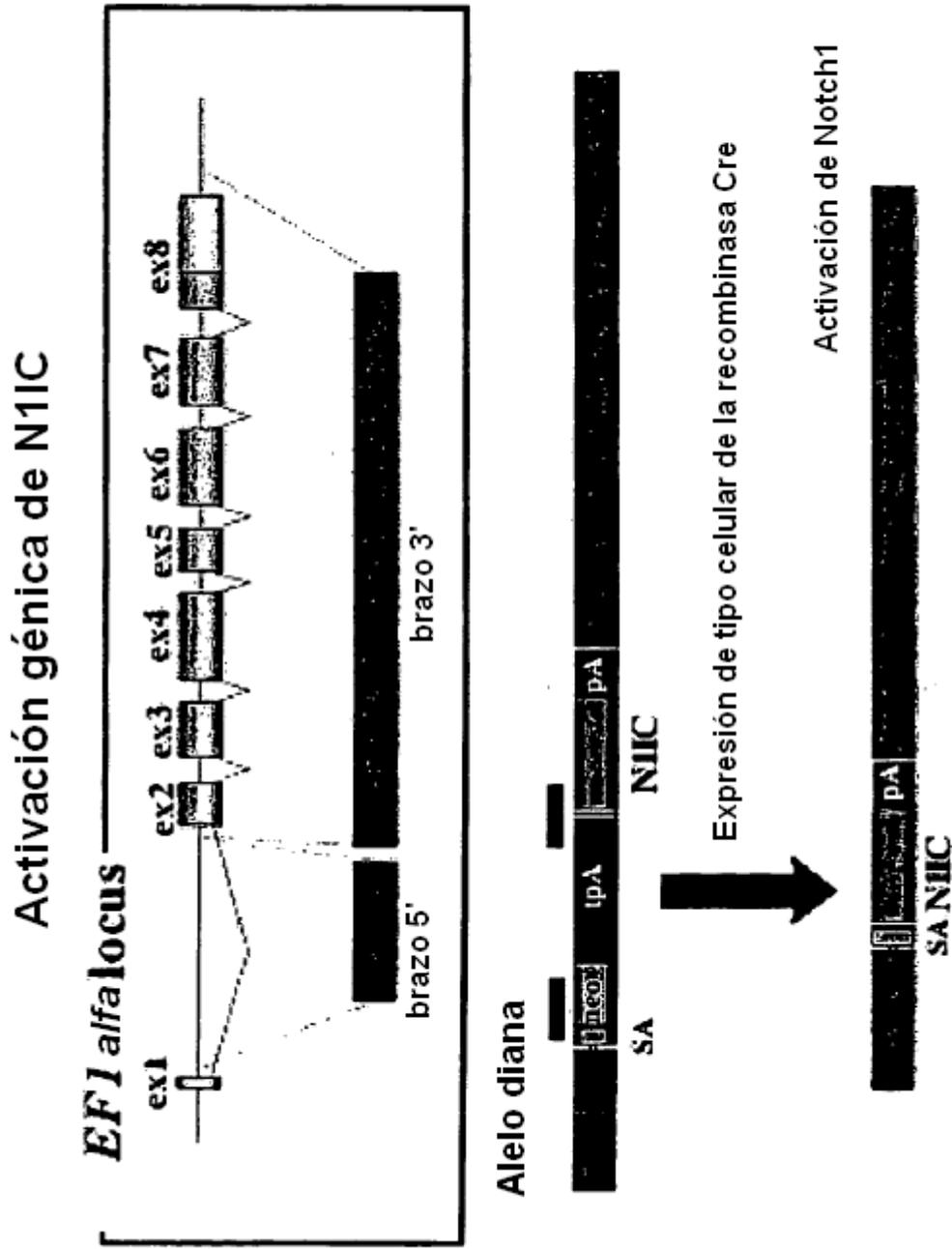
5

Figura 48



**Prox1 induce genes diana de Notch de manera dependiente de la señalización de Notch en células endoteliales sanguíneas.** Se infectaron HUVEC con adenovirus que codifican, LacZ, Prox1, N1IC o N4/int-3. El Compuesto E (cE), inhibidor de presenilina que inhibe la señalización de Notch, se incubó durante 24 horas en HUVEC infectadas bien con Ad-LacZ o Ad-Prox1 y se aisló el ARN total. Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa para los genes diana de Notch endoteliales, VEGFR-3, EfrinaB2 y Hey2. La inducción mediada por Prox1 de los genes diana de Notch, efrinaB2, VEGFR-3 y Hey2 se inhibió por la adición del inhibidor de la señalización de Notch, Compuesto E. Así, Prox1 regula la expresión de efrinaB2, VEGFR-3 y Hey2 a través de Notch.

5



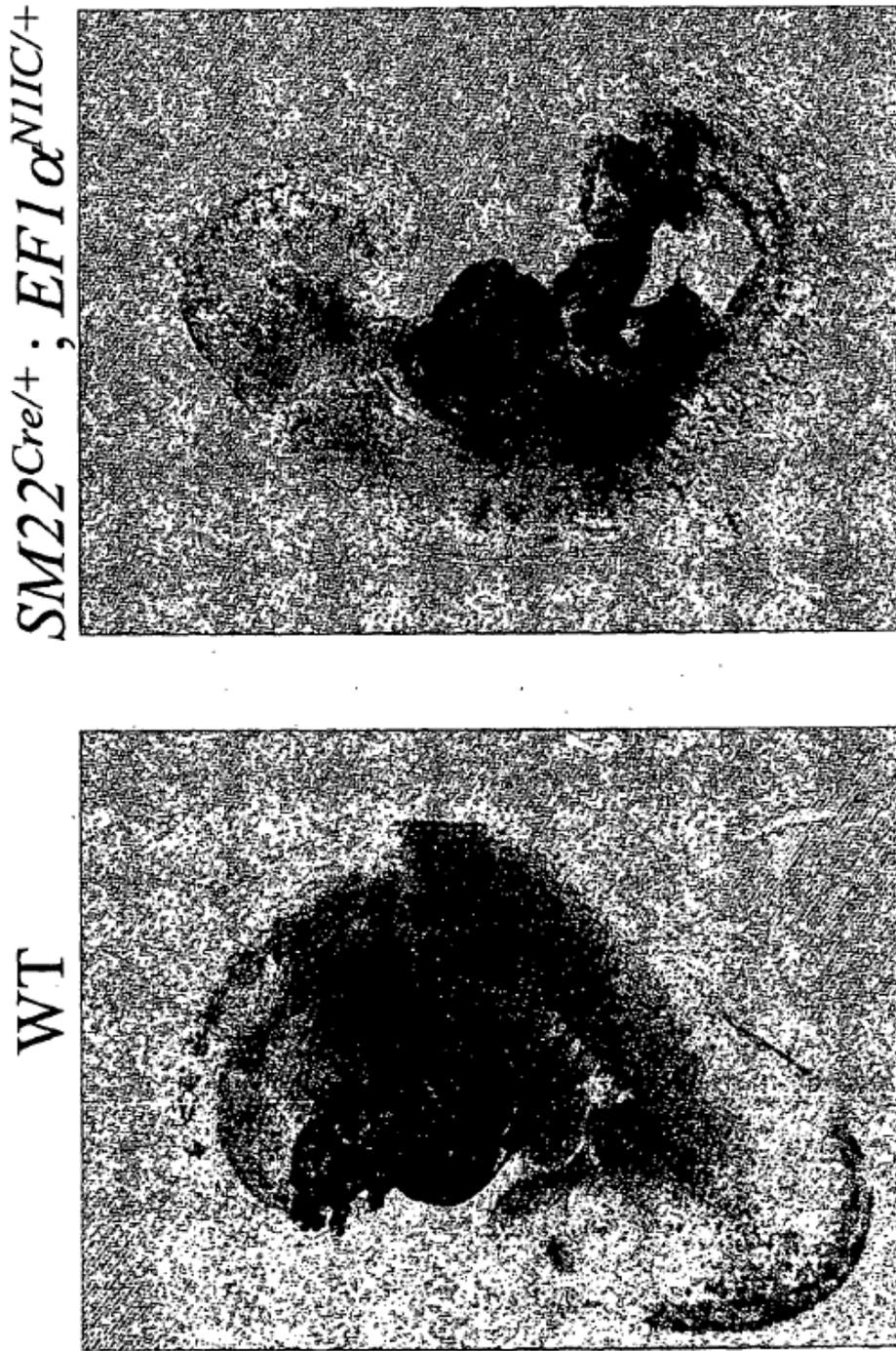
**Figura 49. Esquema de la activación génica de N1IC.** Se insertó una forma activada de Notch1 en el locus de EF1 alfa flanqueado por dos sitios LoxP. Después de la expresión de la recombinasa Cre, el casete neo/tPA se expresa bajo el control del promotor ubicuo EF1 alfa.

| <u>Genotipo</u>  | <u>Predicho</u> | <u>E9.5*</u> | <u>P21†</u> |
|--|-----------------|--------------|-------------|
| WT   | 25%             | 30.7%        | 37.5%       |
| SM22 <sup>Cre/+</sup>                                  | 25%             | 22.7%        | 30%         |
| EF1 $\alpha$ <sup>N11C/+</sup>                         | 25%             | 22.7%        | 37.5%       |
| SM22 <sup>Cre/+</sup> ; EF1 $\alpha$ <sup>N11C/+</sup> | 25%             | 21.3%        | 0%          |
| * n = 75, p > 0.2; † n = 80, p < 0.001                 |                 |              |             |

SM22<sup>Cre/+</sup> SM22<sup>Cre/+</sup>; EF1 $\alpha$ <sup>N11C/+</sup>



**Figura 50. La activación de Notch en células de músculo liso vascular que expresan SM22 resulta en letalidad embrionaria antes de E10.5. No se observaron ratones SM22<sup>Cre/+</sup>; EF1 $\alpha$ <sup>N11C/+</sup> viables en el día postnatal 21 (P21) con un valor de p menor de 0,001. En el día embrionario E9.5, se observó un número predicho de embriones SM22<sup>Cre/+</sup>; EF1 $\alpha$ <sup>N11C/+</sup>, pero tenían un retraso grave en el crecimiento comparado con sus compañeros de camada control (Panel inferior).**



**Figura 51.** La activación de Notch en células de músculo liso vascular que expresan SM22 altera la expresión de actina alfa en células de músculo liso. Los embriones E9.5 se inmunotizaron íntegramente para actina alfa de músculo liso. La expresión de actina alfa de células de músculo liso se alteró en los embriones SM22<sup>Cre/+</sup>; EF1 $\alpha$ <sup>N1IC/+</sup> comparado con los controles WT. Así, la activación de la señal Notch en las células de músculo liso vascular interrumpe el desarrollo cardiovascular.