

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 229**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2010 E 10762827 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2483311**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas anti-Notch3 para el tratamiento de una leucemia de linfocitos T positiva a un inhibidor de la gamma-secretasa que no responde a un anticuerpo antagonista anti-Notch1**

30 Prioridad:

30.09.2009 US 247298 P

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

22.08.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

SIEBEL, CHRISTIAN W.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 580 229 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

Anticuerpos antagonistas anti-Notch3 para el tratamiento de una leucemia de linfocitos T positiva a un inhibidor de la gamma-secretasa que no responde a un anticuerpo antagonista anti-Notch1

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de tratamiento del cáncer en general, y de la leucemia en particular, usando anticuerpos antagonistas de Notch1 y Notch3 en solitario o en combinación. También se proporcionan composiciones y métodos para el tratamiento y diagnóstico de cánceres asociados con Notch.

10

Antecedentes

La familia de receptores de Notch es una clase de receptores transmembrana conservados evolutivamente que transmiten señales que afectan al desarrollo en organismos tan diversos como los erizos de mar y los seres humanos. Los receptores de Notch y sus ligandos Delta y Serrate (conocidos como Jagged (Dentado) en mamíferos) son proteínas transmembrana con grandes dominios extracelulares que contienen repeticiones de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF, acrónimo de *epidermal growth factor*). El número de parálogos de Notch difiere entre especies. Por ejemplo, en mamíferos hay cuatro receptores de Notch (Notch1-Notch4), dos en *Caenorhabditis elegans* (LIN-12 y GLP-1) y uno en *Drosophila melanogaster* (Notch). Los receptores de Notch se procesan proteolíticamente durante el transporte a la superficie celular mediante una proteasa de tipo furina en un sitio S1, que es N-terminal con respecto al dominio transmembrana, produciendo una subunidad extracelular de Notch (ECN) y una subunidad transmembrana de Notch (TMN). Estas dos subunidades permanecen asociadas de forma no covalente y constituyen el receptor de la superficie celular heterodimérico maduro.

15

20

25

Las subunidades ECN de Notch1 contienen 36 repeticiones de tipo EGF N-terminales seguidas de tres módulos repetidos en tándem de repeticiones LIN12/Notch (LNR) que preceden al sitio S1. La ECN de Notch3 tiene una estructura similar, pero con 34 repeticiones de tipo EGF. Cada módulo LNR contiene tres enlaces disulfuro y un grupo de restos ácidos y polares conservados que se predice que coordinan a un ion de calcio. Dentro de la región de repetición de EGF, se encuentran los sitios de unión para los ligandos activadores. Las TMN de Notch1 y Notch3 comprenden una región extracelular (que porta el sitio de escisión de S2), un segmento transmembrana (que porta el sitio de escisión de S3), y una gran región intracelular (ICN o ICD) que incluye un dominio de RAM, repeticiones de anquirina, un dominio de transactivación y un dominio de PEST carboxi-terminal. La asociación estable de las subunidades ECN y TMN depende de un dominio de heterodimerización (HD) que comprende el extremo carboxi-terminal del ECN (denominado HD-N) y el extremo amino-terminal extracelular de TMN (denominado HD-C). Antes de la activación inducida por ligando, Notch se mantiene en una conformación de reposo mediante una región reguladora negativa (RRN), que comprende los tres LNR y el dominio HD.

30

35

La unión de un ligando de Notch a la subunidad ECN inicia dos escisiones proteolíticas sucesivas que se producen mediante proteólisis intramembrana regulada. La primera escisión mediante una metaloproteasa (ADAM17) en el sitio S2 vuelve la subunidad transmembrana de Notch susceptible a una segunda escisión en el sitio S3 próximo a la cara interna de la membrana plasmática. La escisión en el sitio S3, que está catalizada por un complejo multiproteico que contiene presenilina y nicastrina, y que potencia la actividad de γ -secretasa, libera la parte intracelular de la subunidad transmembrana de Notch, permitiendo que se traslade al núcleo y active la transcripción de los genes diana. (Para una revisión de la escisión proteolítica de Notch, véase, por ejemplo, Sisodia *et al.*, *Nat. Rev. Neurosci.* 3:281-290, 2002).

40

45

Se han identificado cinco ligandos de Notch de las clases Jagged y de tipo Delta en seres humanos (Jagged1 (también denominado Serrate1), Jagged2 (también denominado Serrate2), de tipo Delta 1 (también denominado DLL1), de tipo Delta 3 (también denominado DLL3) y de tipo Delta 4 (también denominado DLL4)). Cada uno de los ligandos es una proteína transmembrana de un solo pase con un motivo N-terminal conservado Delta, Serrate, LAG-2 (DSL) esencial para la unión a Notch. Una serie de módulos de tipo EGF C-terminales con respecto al motivo DSL preceden al segmento que abarca la membrana. A diferencia de los receptores de Notch, los ligandos tienen colas citoplasmáticas cortas de 70-215 aminoácidos en el extremo C-terminal. Además, se ha informado de otros tipos de ligandos (por ejemplo, DNER, NB3 y F3/Contactina). (Para una revisión de los ligandos de Notch y de la activación de Notch mediada por ligandos, véase, por ejemplo, D'Souza *et al.*, *Oncogene* 27:5148-5167, 2008).

50

55

La vía Notch funciona durante diversos procesos del desarrollo y fisiológicos incluyendo aquellos que afectan a la neurogénesis en moscas y vertebrados. En general, la señalización de Notch está implicada en la inhibición lateral, las decisiones de linaje y el establecimiento de límites entre grupos de células (véase, por ejemplo, Bray, *Mol. Cell Biol.* 7:678-679, 2006). Una variedad de enfermedades humanas, incluyendo cánceres y trastornos neurodegenerativos, han demostrado ser el resultado de mutaciones en genes que codifican receptores de Notch o sus ligandos (véase, por ejemplo, Nam *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:501-509, 2002).

60

Se demostró el papel de Notch1 como una oncoproteína en la leucemia que implica células progenitoras de linfocitos T. Este papel fue reconocido por primera vez en la leucemia linfoblástica aguda humana (LLA-T). (Véase, por

65

ejemplo, Aster *et al.*, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3: 587-613, 2008). La LLA-T es una leucemia agresiva que afecta preferentemente a niños y adolescentes. Se identificó una translocación cromosómica t(7;9)(q34;q34.3) recurrente, que crea una variante truncada constitutivamente activa de Notch1 humana, en un subconjunto de LLA-T. Más tarde, además de la translocación (7;9), se descubrieron las mutaciones de ganancia de función frecuentes en Notch1 humana en más del 50 % de todas las LLA-T humanas. (Véase Weng *et al.*, *Science*, 306:269-271, 2004). Dichas mutaciones se producen en el dominio HD extracelular y el dominio PEST intracelular. Otros estudios demostraron que la expresión de base retroviral de ICN de Notch1 en células de médula ósea causaron LAA-T en modelos de ratones que recibieron las células de médula ósea trasplantadas. (Véase Aster *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 20:7505-7515, 2000).

En consonancia con este papel de Notch1 en la leucemia que implica células progenitoras de linfocitos T, la señalización de Notch1 ha demostrado ser esencial para el desarrollo de los linfocitos T en modelos de ratón, y las señales mediadas por Notch1 potencian el desarrollo de los linfocitos T a expensas del desarrollo de los linfocitos B. (Véase, por ejemplo, Wilson *et al.*, *J. Exp. Med.* 194:1003-1012, 2001). Se han descrito más papeles para Notch1 en la leucemia. Se ha informado de mutaciones de activación en el dominio PEST de Notch1 a baja frecuencia en la leucemia mieloide aguda humana (LMA) y en las leucemias de conmutación de linaje, lo que sugiere que las mutaciones de activación en Notch1 pueden ocurrir en una célula madre leucémica que preceda al compromiso mieloide y de linaje T. (Véase Palomero *et al.*, *Leukemia*. 20:1963-1966, 2006).

Antes del descubrimiento de las mutaciones de ganancia de función de Notch1 frecuentes en la LLA-T, se observó que la expresión forzada de ICN de Notch3 en el timo causó leucemia de linfocitos T/linfoma en ratones transgénicos. (Véase Bellavia *et al.*, *EMBO J.* 19:3337-3348, 2000). También se informó que el ARNm de Notch3 se expresó en las treinta muestras analizadas de pacientes con LAA-T, mientras que no se detectó en las leucemias de linfocitos T normales de sangre periférica y leucemias no T. (Véase Bellavia *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 99: 3788-3793, 2002).

Notch1 y Notch3 también se asocian con una variedad de cánceres. Por ejemplo, en los tumores sólidos, se ha observado un aumento de la expresión de Notch1 en los cánceres humanos de cuello uterino, colon, pulmón, páncreas, piel y cerebro (véase, por ejemplo, Leong *et al.*, *Blood* 107:2223-2233, 2006) y la expresión elevada de Notch1 se correlaciona con un mal pronóstico del cáncer de mama (véase, por ejemplo, Parr *et al.*, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-786, 2004; Reedijk *et al.*, *Cancer Res.* 65:8530-8537, 2005). Se ha identificado una translocación cromosómica (15;19) en un subconjunto de tumores de pulmón no microcíticos, y se cree que la translocación eleva la transcripción de Notch3. En el cáncer de ovario, se encontró que se produce la amplificación del gen Notch3 en ~19 % de los tumores, y se encontró la sobreexpresión de Notch3 en más de la mitad de los carcinomas serosos de ovario. La sobreexpresión de Notch1 y Notch3 activadas en ratones transgénicos induce tumores de mama de ratón, y la sobreexpresión de Notch3 es suficiente para inducir la formación de tumores del plexo coroideo en un modelo de ratón, lo que sugiere un papel de Notch3 en el desarrollo de ciertos tumores cerebrales. (Para una revisión de Notch3 en el cáncer, véase Shih *et al.*, *Cancer Res.* 67:1879-1882, 2007).

Se han descrito determinados anticuerpos antagonistas anti-Notch1 que tienen eficacia terapéutica (véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2009/0081238 A1). Por ejemplo, dichos anticuerpos se unen a la región de regulación negativa (RRN) de Notch1, bloquean la señalización de Notch1, perturban la angiogénesis y la vascularización, e inhiben el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de ratón de carcinoma de pulmón no microcítico y adenocarcinoma de colon. Ciertos anticuerpos descritos en la misma se unen a LNR-A y LNR-B (la primera y la segunda de las tres repeticiones LIN12/Notch) y HD-C de la RRN de Notch1. También se han descrito otros anticuerpos anti-Notch1 que se unen a la región de repetición de EGF de Notch1 y bloquean la actividad de Notch1, tal vez mediante el bloqueo de la unión del ligando. (Véase la publicación internacional n.º WO 2008/091641).

También se han descrito determinados anticuerpos antagonistas anti-Notch3. (Véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2008/0226621 A1). Dichos anticuerpos se unen a la región de regulación negativa (RRN) de Notch3 y bloquean la señalización de Notch3. Ciertos anticuerpos descritos en la misma se unen a LNR-A (la primera de las tres repeticiones LIN12/Notch) y HD-C (denominado alternativamente segundo dominio de dimerización en el documento US 2008/0226621 A1) de RRN de Notch3. También se han descrito otros anticuerpos anti-Notch3 que se unen a la región de repetición de tipo EGF de Notch3 y bloquean la actividad de Notch3, quizás mediante el bloqueo de la unión al ligando. (Véase Li *et al.*, *J. Biol. Chem.* 283:8046-8054, 2008).

Se han propuesto los inhibidores de gamma-secretasa (GSI), que son inhibidores de pan-Notch que inhiben múltiples receptores de Notch, para el tratamiento de enfermedades relacionadas con Notch y, de hecho, se han usado en ensayos clínicos para el tratamiento de la LAA-T. (Véase Roy *et al.*, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 52-59, 2007; Deangelo *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings, Parte I, 24: 6586, 2006). Sin embargo, los GSI provocan pérdida de peso y la metaplasia de las células caliciformes intestinales, lo que refleja el papel que desempeña Notch en la determinación del destino de las células mediante el mantenimiento de la proliferación de las células progenitoras de la cripta intestinal y la prohibición de la diferenciación hacia un destino de célula secretora. (Véase van Es *et al.*, *Nature* 435:959-963, 2005). A pesar de que estos efectos secundarios de la inhibición de pan-Notch pueden ser manejables en un entorno clínico, los inhibidores que se dirigen a receptores de

Notch individuales y, por lo tanto, minimizan o reducen estos efectos secundarios, pueden ser ventajosos.

Existe la necesidad en la técnica de métodos terapéuticos adicionales de tratamiento del cáncer, dirigidos a los receptores de Notch. La invención descrita en el presente documento cubre las necesidades descritas anteriormente y proporciona otros beneficios.

Sumario

La presente divulgación se refiere al tratamiento del cáncer usando antagonistas de Notch por separado o en combinación. La presente divulgación se refiere específicamente, en parte, a la caracterización de las diferentes clases de LAA-T. Una clase de LAA-T es sensible al tratamiento con GSI y también es sensible al tratamiento con un antagonista específico de Notch1. Por el contrario, otra clase de LAA-T es sensible al tratamiento con GSI, pero insensible (es decir, resistente) al tratamiento con un antagonista específico de Notch1. Como se muestra en el presente documento, la última clase de LAA-T es parcialmente sensible al tratamiento con un anticuerpo antagonista específico de Notch3, y aún más sensible a una combinación de un anticuerpo antagonista específico de Notch1 y un anticuerpo antagonista específico de Notch3. Estos resultados sugieren un papel tanto de Notch1 como de Notch3 en las leucemias, particularmente en las leucemias progenitoras de linfocitos T tales como LAA-T.

En un aspecto, se proporciona un método de tratamiento de un cáncer sensible a GSI que no responde a un anticuerpo antagonista específico de Notch1, comprendiendo el método administrar a un paciente que tiene dicho cáncer una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch3. En ciertas realizaciones, el cáncer es leucemia de linfocitos T. En ciertas realizaciones, la leucemia de linfocitos T es una leucemia linfoblástica. En ciertas realizaciones, la leucemia de linfocitos T es LAA-T. En ciertas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch3 es un anticuerpo anti-RRN de Notch3. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-RRN de Notch3 se une a los dominios LNR-A y HD-C de RRN de Notch3. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-RRN de Notch3 comprende las CDR de la región variable de cadena pesada y ligera de anticuerpo 256A-4 que comprende la secuencia de aminoácidos de 9, 10, 11, 12, 13 y 14 o 256A-8 que comprende la secuencia de aminoácidos de 15, 16, 17, 18, 19 y 20. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-RRN de Notch3 es una forma humanizada del anticuerpo 256A-4 o 256A-8. En ciertas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch3 es un anticuerpo anti-Notch3 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch3.

En una realización adicional, el método comprende además administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch1 que se administra es un anticuerpo antagonista anti-Notch1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo anti-RRN de Notch1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-RRN de Notch1 se une a los dominios LNR-A, LNR-B y HD-C de RRN de Notch1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-RRN de Notch1 se selecciona entre el Anticuerpo A (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 34, 35, 36 y 37), A-1 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 31, 34, 35, 36 y 38), A-2 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 32, 34, 35, 36 y 39) y A-3 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 33, 34, 35, 36 y 40). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-RRN de Notch1 comprende las CDR de la región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado de: el anticuerpo A (que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 22), el anticuerpo A-1 (que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 23 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 24), el anticuerpo A-2 (que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 25 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 26) y el anticuerpo A-3 (que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 27 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 28). En ciertas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo anti-Notch1 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch1.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une a la ICD de Notch3 activa. En ciertos aspectos de la divulgación, el anticuerpo se une al péptido de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo es policlonal. En ciertos aspectos de la divulgación, el anticuerpo es monoclonal.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método de identificación de un cáncer que es adecuado para el tratamiento con un antagonista de Notch3, comprendiendo el método poner en contacto una muestra del cáncer con el anticuerpo de la reivindicación 13, y determinar si hay niveles aumentados significativamente de Notch3 activada en la muestra, en la que la presencia de niveles aumentados significativamente de Notch3 activada indica que el cáncer es adecuado para el tratamiento con un antagonista de Notch3. En ciertos aspectos, el cáncer es sensible a GSI.

Los anteriores aspectos y realizaciones de la invención, y otros adicionales, se proporcionan en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A-1D muestra un alineamiento de Notch1 humana (SEQ ID NO: 1) y Notch1 de ratón (SEQ ID NO: 2), con motivos y otras características indicados.

La Figura 2 muestra la secuencia de Notch3 humana (SEQ ID NO: 3). La región de repetición de EGF se extiende desde el resto de aminoácido 43 al 1.383; los módulos LNR se extienden desde el resto de aminoácido 1.384 al 1.503, extendiéndose LNR-A desde el resto de aminoácido 1.384 al 1.422; y el dominio de dimerización se extiende desde el resto de aminoácido 1.504 al 1.640, extendiéndose HD-C desde el resto de aminoácido 1.572 al 1.640.

5 La Figura 3A-3D muestra que la línea celular de LAA-T, P-12 Ichikawa, es resistente tanto a GSI (DAPT) como a anti-RRN1 (α -N1).

La Figura 4A-4D muestra que la línea celular de LAA-T, HPB-ALL, es sensible tanto a GSI (DAPT) como a anti-RRN1 (α -N1), como se evidencia por la acumulación de células en G0/G1 y la reducción de células en S/G2/M, en relación con las células de control.

10 La Figura 5A-5D muestra que la línea celular de LAA-T, TALL-1, es sensible a GSI, pero resistente a anti-RRN1 (α -N1).

La Figura 6 muestra que las mediciones del tamaño de célula reflejan las tres clases de LAA-T identificadas en las Figuras 3-5.

15 La Figura 7 muestra que la tinción con anexina V (marcador de la apoptosis) y 7-AAD (marcador de la muerte celular) refleja las tres clases de LAA-T identificadas en las Figuras 3-5.

La Figura 8, panel izquierdo, muestra que la tinción con Ki-67 (marcador para la proliferación celular) refleja las tres clases de LAA-T identificadas en las Figuras 3-5. Los picos desplazados hacia la izquierda indican la tinción inferior para Ki-67 y la disminución de la proliferación en relación con los picos desplazados a la derecha. La Figura 8, panel de la derecha, muestra que la disminución de la tinción de Ki-67 (es decir, la disminución de la proliferación) es inversamente proporcional al número de células doble negativas en Anexina V/7-AAD (es decir, no apoptóticas).

20 La Figura 9A-9F muestra que la línea celular de LAA-T es parcialmente sensible a anti-RRN3 (α -N3), y sensible al tratamiento con anti-RRN1 (α -N1) y anti-RRN3.

La Figura 10A-10F muestra que la línea celular de LAA-T, CCRF-CEM, es resistente tanto a GSI, como a anti-RRN1 (α -N1) y a anti-RRN3 (α -N3).

25 La Figura 11A-11F muestra que la línea celular de LAA-T es sensible a anti-RRN1 (α -N1), pero no a anti-RRN3 (α -N3).

La Figura 12 muestra una inmunotransferencia usando un anticuerpo que reconoce la ICD de Notch3 activada (ICD de α -Notch3), que detecta ICD de Notch3 activada en la fracción nuclear de células MDA-MB-468 estimuladas con Jag 1.

30 La Figura 13 muestra que la línea celular de LAA-T expresa altos niveles de Notch3 activada, escindida, (panel inferior), que pueden ser bloqueados por DAPT, pero no por anti-RRN1 (α -N1), mientras que la línea celular de LAA-T expresa niveles altos de Notch1 activada, escindida, que pueden ser bloqueados por DAPT y anti-RRN1 (α -N1).

La Figura 14 muestra un gráfico de los resultados de los experimentos representados en la Figura 9A-9F.

35 Descripción detallada de realizaciones

I. Definiciones

40 Con el fin de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones. En el caso de que cualquier definición establecida a continuación entre en conflicto con cualquier documento citado en el presente documento, prevalecerá la definición expuesta a continuación.

45 El término "Notch", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente lo contrario, a cualquier polipéptido Notch variante o nativo (Notch1-4). La expresión "secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas naturales (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular o una secuencia de subunidad transmembrana), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas naturales. La expresión "Notch de tipo silvestre" se refiere, en general, a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína Notch no mutada, natural. La expresión "secuencia de Notch de tipo silvestre" se refiere, en general, a una secuencia de aminoácidos encontrada en una Notch no mutada, natural.

50 El término "Notch1", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente lo contrario, a cualquier polipéptido Notch1 variante o nativo. La expresión "secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas naturales (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular o una secuencia de subunidad transmembrana), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas naturales. La expresión "Notch1 de tipo silvestre" se refiere, en general, a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína Notch1 no mutada, natural. La expresión "secuencia de Notch1 de tipo silvestre" se refiere, en general, a una secuencia de aminoácidos encontrada en una Notch1 no mutada, natural.

55 La expresión "ligando de Notch1", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente lo contrario, a cualquier polipéptido ligando de Notch1 nativo o variante (por ejemplo, Jagged1, Jagged2, Delta de tipo 1, Delta de tipo 3 y/o Delta de tipo 4). La expresión "secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas naturales (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular o una secuencia de subunidad transmembrana), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas naturales. La expresión "ligando de Notch1 de tipo silvestre" se refiere, en general, a

un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un ligando de Notch1 no mutado, natural. La expresión "secuencia de ligando de Notch1 de tipo silvestre" se refiere, en general, a una secuencia de aminoácidos encontrada en un ligando de Notch1 no mutado, natural.

5 La expresión "RRN de Notch1", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente lo contrario, a cualquier región de polipéptido nativo o variante de Notch1 que consiste en los 3 módulos LNR y las secuencias de aminoácidos que se extienden desde el extremo carboxi-terminal de los módulos LNR hasta el dominio transmembrana, incluyendo dichas secuencias el dominio HD (HD-N y HD-C). Las RRN de Notch1 ilustrativas consisten en la región desde aproximadamente el aminoácido 1.446 hasta aproximadamente el aminoácido 1.735 de la secuencia de aminoácidos de Notch1 humana (SEQ ID NO: 1, Figura 1) y la región desde aproximadamente el aminoácido 1.446 hasta aproximadamente el aminoácido 1.725 de la secuencia de aminoácidos de Notch1 de ratón (SEQ ID NO: 2, Figura 1). La expresión "RRN de Notch1 de secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas naturales, formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas naturales de una RRN de Notch1. La expresión "RRN de Notch1 de tipo silvestre" se refiere, en general, a una RRN de Notch1 no mutada, natural. En algunas realizaciones, una RRN de Notch1 está contenida en una Notch1, tal como, por ejemplo, una Notch1 procesada en el/los sitio/s S1, S2 y/o S3, o una Notch1 sin procesar. En algunas realizaciones, una RRN de Notch1 contiene dos o más fragmentos enlazados de forma no covalente de una secuencia de aminoácidos de RRN de Notch1, por ejemplo, un fragmento que contiene los aminoácidos 1.446 a 1.664 de la SEQ ID NO: 1 enlazado de forma no covalente a un fragmento que contiene los aminoácidos 1.665 a 1.735 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, un fragmento que contiene los aminoácidos 1.446 a 1.654 de SEQ ID NO: 2 está enlazado de forma no covalente a un fragmento que contiene los aminoácidos 1.655 a 1.725 de la SEQ ID NO: 2.

La expresión "aumento de la señalización de Notch1", como se usa en el presente documento, se refiere a un aumento de la señalización de Notch1 que es significativamente superior al nivel de la señalización de Notch1 observado en un control en condiciones esencialmente idénticas. En ciertas realizaciones, el aumento en la señalización de Notch1 es al menos dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o diez veces superior al nivel observado en el control.

La expresión "reducción de la señalización de Notch1", como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción de la señalización de Notch1 que está significativamente por debajo del nivel de la señalización de Notch1 observado en un control en condiciones esencialmente idénticas. En ciertas realizaciones, la reducción en la señalización de Notch1 es al menos dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o diez veces por debajo del nivel observado en el control.

En ciertas realizaciones, la señalización de Notch1 (es decir, el aumento o la reducción de la señalización de Notch1) se evalúa usando un ensayo de indicador adecuado, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 5 de la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2009/0081238 A1. En ciertas realizaciones, la señalización de Notch1 se evalúa usando un ensayo de actividad *in vitro*, tal como el ensayo de diferenciación de mioblastos C2C12 o el ensayo de crecimiento de células HUVEC, como se describe en los Ejemplos 5 y 7, respectivamente, del documento US 2009/0081238 A1. En ciertas realizaciones, la señalización de Notch1 se evalúa usando un modelo de xenoinjerto *in vivo* tal como los modelos de Calu6 y HM7 descritos en el Ejemplo 8 del documento US 2009/0081238 A1.

Las expresiones "mutación de activación de Notch1" y "mutación que activa la señalización de Notch1" se refieren a una inserción de uno o más aminoácidos, una delección de uno o más aminoácidos, o una sustitución de uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de Notch1 que produce un aumento de la señalización de Notch1 en comparación con la señalización de Notch1 a partir de la correspondiente secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de Notch1, o a una inserción de uno o más nucleótidos, una delección de uno o más nucleótidos, una translocación de uno o más nucleótidos, o una sustitución de uno o más nucleótidos con respecto a una secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre de Notch1 que produce un aumento de la señalización de Notch1 en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico mutante en comparación con señalización de Notch1 en una célula que contiene la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre de Notch1. La señalización de Notch1 de un receptor de Notch1 que contiene una mutación de activación puede ser dependiente del ligando o independiente del ligando.

La expresión "anticuerpo anti-Notch1" o "un anticuerpo que se une a Notch1" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a Notch1 con una afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a Notch1. Preferentemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-Notch1 con una proteína no Notch, no relacionada, es inferior al aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo con Notch1 medido, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a Notch1 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 0,5 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,5 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-Notch1 se une a un epitopo de Notch1 que se conserva entre Notch1 de diferentes especies, por ejemplo, roedores (ratones, ratas) y primates.

La expresión "anticuerpo anti-RRN de Notch1" o "un anticuerpo que se une a RRN de Notch1" se refiere a un

- anticuerpo que es capaz de unirse a RRN de Notch1 con una afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a Notch1. Preferentemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-RRN de Notch1 con una proteína no Notch, no relacionada, es inferior al aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo con la RRN de Notch1 medido, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a RRN de Notch1 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq \mu\text{M}$, $\leq 0,5 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $< 0,5 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-RRN de Notch1 se une a un epítipo de Notch1 que se conserva entre Notch de diferentes especies, por ejemplo, roedores (ratones, ratas) y primates.
- La expresión "antagonista específico de Notch1" se refiere a un agente que efectúa la reducción de la señalización de Notch1, como se define anteriormente, y no afecta significativamente a la señalización por otro receptor de Notch (Notch2, 3, o 4 en los mamíferos).
- Un "anticuerpo antagonista anti-Notch1" es un anticuerpo anti-Notch1 (incluyendo un anticuerpo anti-RRN de Notch1) que efectúa la reducción de la señalización de Notch1, como se ha definido anteriormente.
- La referencia a "Anticuerpo A, A-1, A-2 y A-3", individualmente o en cualquier combinación, significa las regiones variables de cadena pesada y ligera de los fagos y los anticuerpos reformateados designados Anticuerpo A, A-1, A-2 y A -3 en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2009/0081238 A1, en la que el Anticuerpo A comprende la cadena pesada de SEC ID NO: 21 y la cadena ligera de SEC ID NO: 22; el Anticuerpo A-1 comprende la cadena pesada de SEC ID NO: 23 y la cadena ligera de SEC ID NO: 24; el Anticuerpo A-2 comprende la cadena pesada de SEC ID NO: 25 y la cadena ligera de SEC ID NO: 26; y el Anticuerpo A-3 comprende la cadena pesada de SEC ID NO: 27 y la cadena ligera de SEC ID NO: 28; a menos que se indique lo contrario.
- El término "Notch3", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente lo contrario, a cualquier polipéptido Notch3 variante o nativo. La expresión "secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas naturales (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular o una secuencia de subunidad transmembrana), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas naturales. La expresión "Notch3 de tipo silvestre" se refiere, en general, a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína Notch3 no mutada, natural. La expresión "secuencia de Notch3 de tipo silvestre" se refiere, en general, a una secuencia de aminoácidos encontrada en una Notch3 no mutada, natural.
- La expresión "ligando de Notch3", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente lo contrario, a cualquier polipéptido ligando de Notch3 nativo o variante (por ejemplo, Jagged1, Jagged2, Delta de tipo 1, Delta de tipo 3 y/o Delta de tipo 4). La expresión "secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas naturales (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular o una secuencia de subunidad transmembrana), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas naturales. La expresión "ligando de Notch3 de tipo silvestre" se refiere, en general, a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un ligando de Notch3 no mutado, natural. La expresión "secuencia de ligando de Notch3 de tipo silvestre" se refiere, en general, a una secuencia de aminoácidos encontrada en un ligando de Notch3 no mutado, natural.
- La expresión "ICD de Notch3 activada" se refiere al producto de escisión de Notch3 que se produce como consecuencia de la escisión en el sitio S3 y que es capaz de trasladarse al núcleo. En ciertas realizaciones, la ICD de Notch3 activada consiste en los aminoácidos 1.662-2.321 de Notch3 humana (SEQ ID NO: 3).
- La expresión "RRN de Notch3", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente lo contrario, a cualquier región de polipéptido nativo o variante de Notch3 que consiste en los 3 módulos LNR y las secuencias de aminoácidos que se extienden desde el extremo carboxi-terminal de los módulos LNR hasta el dominio transmembrana, incluyendo dichas secuencias el dominio HD (HD-N y HD-C). Las RRN de Notch3 ilustrativas consisten en la región desde aproximadamente el aminoácido 1.384 hasta aproximadamente el aminoácido 1.640 de la secuencia de aminoácidos de Notch3 humana (SEQ ID NO: 3, Figura 2). La expresión "RRN de Notch3 de secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas naturales, formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas naturales de una RRN de Notch3. La expresión "RRN de Notch3 de tipo silvestre" se refiere, en general, a una RRN de Notch3 no mutada, natural. En algunas realizaciones, una RRN de Notch3 está contenida en una Notch3, tal como, por ejemplo, una Notch3 procesada en el/los sitio/s S1, S2 y/o S3, o una Notch3 sin procesar. En algunas realizaciones, una RRN de Notch3 contiene dos o más fragmentos enlazados de forma no covalente de una secuencia de aminoácidos de RRN de Notch3, por ejemplo, un fragmento que contiene los aminoácidos 1.384 a 1.571 de la Notch3 humana (SEQ ID NO: 3) enlazado de forma no covalente a un fragmento que contiene los aminoácidos 1.572 a 1.640 de la Notch3 humana (SEQ ID NO: 3).
- La expresión "aumento de la señalización de Notch3", como se usa en el presente documento, se refiere a un aumento de la señalización de Notch3 que es significativamente superior al nivel de la señalización de Notch3 observado en un control en condiciones esencialmente idénticas. En ciertas realizaciones, el aumento en la

señalización de Notch3 es al menos dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o diez veces superior al nivel observado en el control.

5 La expresión "reducción de la señalización de Notch3", como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción de la señalización de Notch3 que está significativamente por debajo del nivel de la señalización de Notch3 observado en un control en condiciones esencialmente idénticas. En ciertas realizaciones, la reducción en la señalización de Notch3 es al menos dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o diez veces por debajo del nivel observado en el control.

10 En ciertas realizaciones, la señalización de Notch3 (es decir, el aumento o la reducción de la señalización de Notch3) se evalúa usando un ensayo de indicador adecuado, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 5 de la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2008/0226621 A1. En ciertas realizaciones, la señalización de Notch3 se evalúa usando un ensayo de actividad *in vitro*, tal como los ensayos de la apoptosis, la migración celular, la invasión y la morfología descritos en el Ejemplo 7 de la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2008/0226621 A1. En ciertas realizaciones, la señalización de Notch3 se evalúa usando un modelo de xenoinjerto *in vivo* tal como los descritos en el Ejemplo 11 del documento US 2008/0226621 A1.

20 La expresión "anticuerpo anti-Notch3" o "un anticuerpo que se une a Notch3" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a Notch3 con una afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a Notch3. Preferentemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-Notch3 con una proteína no Notch, no relacionada, es inferior al aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo con Notch3 medido, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a la RRN de Notch3 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 0,5 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,5 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-Notch3 se une a un epítipo de Notch3 que se conserva entre Notch3 de diferentes especies, por ejemplo, roedores (ratones, ratas) y primates.

30 La expresión "anticuerpo anti-RRN de Notch3" o "un anticuerpo que se une a RRN de Notch3" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a RRN de Notch3 con una afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a Notch3. Preferentemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-RRN de Notch3 con una proteína no Notch, no relacionada, es inferior al aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo con la RRN de Notch3 medido, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a RRN de Notch3 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 0,5 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $< 0,5 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-RRN de Notch3 se une a un epítipo de Notch3 que se conserva entre Notch3 de diferentes especies, por ejemplo, roedores (ratones, ratas) y primates.

40 La expresión "antagonista específico de Notch3" se refiere a un agente que efectúa la reducción de la señalización de Notch3, como se define anteriormente, y no afecta significativamente a la señalización por otro receptor de Notch (Notch1, 2 o 4 en los mamíferos).

Un "anticuerpo antagonista anti-Notch3" es un anticuerpo anti-Notch3 (incluyendo un anticuerpo anti-RRN de Notch3) que efectúa la reducción de la señalización de Notch3, como se ha definido anteriormente.

45 La referencia a "anticuerpo 256A-4 y 256A-8", individualmente o en cualquier combinación, significa los anticuerpos monoclonales de ratón designados 256A-4 que comprenden las región variable de cadena pesada de SEC ID NO: 5 y la región variable de cadena ligera de SEC ID NO: 6; y 256A-8 que comprende la región variable de cadena pesada de SEC ID NO: 7 y la región variable de cadena ligera de SEC ID NO: 8; de la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2008/0226621 A1.

50 El término "antagonista" se refiere a un agente que inhibe significativamente (ya sea parcial o completamente) la actividad biológica de una molécula diana.

55 Un "anticuerpo que se une a la ICD de Notch3 activada" se refiere a un anticuerpo que se une a la ICD de la Notch3 activada de modo que el anticuerpo es útil para distinguir la ICD de Notch3 activada de la Notch3 que comprende un TMN intacto.

60 El término "anticuerpo", en el presente documento, se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada.

65 Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos de investigación, de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, se purifica un anticuerpo (1) a más de un 95 % en peso de anticuerpo determinado mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más del 99 %

en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa giratoria; o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, azul de Coomassie o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, pues al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo, un anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos nativos" normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que determinados restos de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse "VH". El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse "VL". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes del dominio variable difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos, y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo en particular hacia su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (RHV) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más elevadamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectada mediante tres RHV, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las RHV de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las RHV de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen de manera general, por ejemplo, en Abbas *et al. Cellular and Mol. Immunology*, 4^a ed. (W. B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo con otras una o más proteínas o péptidos.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo en su forma esencialmente intacta, no como fragmentos de anticuerpo como se definen más adelante. Las expresiones se refieren, en particular, a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un "anticuerpo desnudo", para los fines del presente documento, es un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o a un radiomarcador.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, comprendiendo preferentemente la región de unión al antígeno de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados

fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y sigue siendo capaz de reticular el antígeno.

5 "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera estrechamente asociado de forma no covalente. En una especie Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de modo que las cadenas ligeras y pesadas pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres RHV de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis RHV confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres RHV específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y de unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

15 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera, y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos cuantos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para Fab', en el que el/los resto/s de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

25 Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL, que permite al scFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthun, en "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), pág. 269-315.

30 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser divalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más detalladamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003) y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetraacuerpos también se describen en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

40 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto en posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica la característica de que el anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos diferenciados. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia polipeptídica de unión a la diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un solo clon de una pluralidad de clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Se ha de entender que es posible alterar una secuencia de unión a la diana seleccionada adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de los preparados de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de un preparado de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante o antígeno. Además de su especificidad, los preparados de anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que normalmente no están contaminados por otras inmunoglobulinas.

60 El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como aquel obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogénea, y se ha de entender que no requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975). Hongo *et al.*, "Hybridoma", 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual", (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681" (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN

recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen la totalidad o partes de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); patente de EE.UU. n.º 5.545.807, 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Biotechnology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una determinada especie o que pertenecen a una clase o subclase determinada de anticuerpos, mientras que el resto de la/s cadena/s es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión al antígeno del anticuerpo se obtiene de un anticuerpo producido mediante, por ejemplo, inmunización de macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en el que los restos de una RHV del receptor se reemplazan por restos de una RHV de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden realizar para mejorar más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá esencialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o esencialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o esencialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998). Harris, *Biochem. Soc. Transaction* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) y las patentes de EE.UU. n.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha producido usando cualquiera de las técnicas de producción de anticuerpos humanos según lo desvelado en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos descritos en Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han deshabilitado, por ejemplo, xenoratoses inmunizados (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 relativas a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 103:3557-3562 (2006) relativa a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de linfocitos B.

La expresión "región hipervariable", "RHV" o "HV", cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis RHV, tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis RHV, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único, confiriendo una especificidad excelente a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, "Immunity" 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en "Methods in Molecular Biology" 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que solo consisten en una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

En el presente documento, se usan y están abarcadas una serie de delineaciones de RHV. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de la secuencia y son las que se usan más comúnmente (Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, en cambio, se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las RHV de los AcM representan un compromiso entre las RHV de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan mediante el software de modelización de anticuerpos monoclonales de Oxford Molecular. Las RHV de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. A continuación, se indican los restos de cada una de estas RHV.

Bucle	Kabat	AcM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Numeración de Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Numeración de Chothia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las RHV pueden comprender "RHV extendidas" de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Los restos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones.

Los restos "marco" o "FR" son aquellos restos del dominio variable distintos de los restos de la RHV, según lo definido en el presente documento.

Las expresiones "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posiciones de aminoácidos como en Kabat" y las variantes de las mismas se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la recopilación de anticuerpos de Kabat *et al.*, *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia lineal de aminoácidos real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o a una inserción en, una FR o RHV del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una sola inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) detrás del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) detrás del resto 82 de la FR de cadena pesada. Se puede determinar la numeración de restos de Kabat para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

En general, el sistema de numeración de Kabat se usa cuando se hace referencia a un resto del dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *supra*). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa, en general, cuando se hace referencia a un resto de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU presentado en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU de IgG1 humana. A menos que se establezca lo contrario en el presente documento, las referencias a los números de restos del dominio variable de los anticuerpos significan la numeración de los restos mediante el sistema de numeración de Kabat. A menos que se establezca lo contrario en el presente documento, las referencias a los números de restos del dominio constante de los anticuerpos significan la numeración de restos mediante el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2008/0181888 A1, con figuras de la numeración EU).

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más RHV del mismo que mejoran la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dicha/s alteración/es. En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se pueden producir usando determinados procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al. BioTechnology* 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante el reordenamiento de los dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de restos de RHV y/o restos marco ha sido descrita, por ejemplo, por Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al., J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995). Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al., J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente del

anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

5 La "afinidad de unión" se refiere, en general, a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar, en general, por su constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, 10 incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad, en general, se unen lentamente al antígeno y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad, en general, se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica, se conoce una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede usar para los fines de la presente invención. A continuación, se describen realizaciones específicas ilustrativas y de ejemplo para medir la afinidad de 15 unión.

En una realización, la " K_d " o el "valor de K_d " de acuerdo con la presente invención se mide mediante un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA), realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab por su antígeno se mide equilibrando 20 el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ^{125}I en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado y, a continuación, capturando el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren durante toda una noche placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno 25 marcado con [^{125}I] con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coincidiendo con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Después, se incuba el Fab de interés durante toda una noche. Sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para asegurarse de que se alcanza el equilibrio. A continuación, se transfieren las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Luego se elimina la solución y se lava la placa ocho veces con TWEEN-20™ al 0,1 % en PBS. Cuando se secan las placas, se añaden 150 μl /pocillo de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard), y se realiza el recuento de las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada 35 Fab que dan una unión inferior o igual al 20 % de la máxima se seleccionan para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, se mide la K_d o el valor de K_d usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con 40 antígeno inmovilizado en chips CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta 45 etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie con factor de dilución de 2 de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN-20™ al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las velocidades de asociación (k_{as}) y las velocidades de disociación (k_{dis}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (software de evaluación BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensoogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la proporción de $k_{\text{dis}}/k_{\text{as}}$. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 50 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación es superior a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de inactivación fluorescente que mida el aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en 55 PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro dotado de detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "velocidad de asociación" o " k_{as} " de acuerdo con la presente invención también se puede determinar, como se describe anteriormente, usando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). 60

Un "trastorno" es cualquier afección o enfermedad que podría beneficiarse del tratamiento con una composición o un método de la invención. Esto incluye trastornos crónicos y agudos que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se tratan en el 65 presente documento incluyen afecciones tales como el cáncer.

Las expresiones "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

5 "Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y toda proliferación celulares neoplásicos, ya sean malignos o benignos, y a todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer" y "canceroso", y las expresiones "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son excluyentes entre sí cuando se citan en el presente documento.

10 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento/proliferación celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer gástrico, melanoma y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. La mala regulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que se pueden tratar mediante las composiciones y los métodos de la invención. Estos trastornos incluyen afecciones tanto no neoplásicas y neoplásicas. Las neoplásicas incluyen, pero sin limitación, las descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen, pero sin limitación, hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), soriasis, placas de soriasis, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatías diabéticas y otras retinopatías proliferativas, incluyendo retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, rechazo de injerto corneal, neovascularización retinal/coroidal, neovascularización del ángulo (Rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluyendo la enfermedad de Grave), trasplante de córnea y de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/SDRA, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, derrames pulmonares malignos, edema cerebral (por ejemplo, asociado con apoplejía aguda/lesión/traumatismo cerrado de cabeza), inflamación sinovial, formación de paño (*pannus*) en la AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad del ovario poliquístico, endometriosis, tercera separación de enfermedades de fluidos (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad del intestino), fibromas uterinos, parto prematuro, inflamación crónica como la EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome nefrótico, crecimiento no deseado o aberrante de masa de tejido (no canceroso), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento capilar, síndrome de Osier-Weber, fibroplasia retrolental de granuloma piógeno, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como la asociada con la pericarditis) y derrame pleural.

40 El término "leucemia" se refiere a una enfermedad aguda o crónica que se caracteriza por un aumento anómalo del número de glóbulos blancos (leucocitos) en los tejidos hemopoyéticos, otros órganos y, a menudo, en la sangre. Las leucemias incluyen, pero sin limitación, leucemia linfoblástica aguda (LLA), incluyendo leucemia linfoblástica aguda del linaje T (LLA-T), así como otras leucemias linfocíticas; leucemia/linfoma de linfocitos T en el adulto; leucemia mieloide crónica (mielógena) (LMC), leucemia mieloide aguda (mielógena) (LMA), y otras leucemias granulocíticas; y leucemias de intercambio de linaje.

50 La expresión "leucemia de linfocitos T" se refiere a una leucemia que se caracteriza por un aumento anómalo en el número de linfoblastos de linaje T o linfocitos T.

La expresión "leucemia de células progenitoras de linfocitos T" se refiere a una leucemia que se caracteriza por un aumento anómalo del número de linfoblastos de linaje T.

55 Un "cáncer sensible al GSI" es un cáncer (tal como una leucemia) que responde a un inhibidor de la gamma secretasa o que respondería a un inhibidor de la gamma secretasa si se tratara con el mismo.

60 Un cáncer que "responde" a un agente terapéutico es aquel que muestra una reducción significativa de la progresión del cáncer o del tumor, incluyendo, pero sin limitación, (1) inhibición, en cierta medida, del crecimiento del tumor, incluyendo la ralentización y la detención completa del crecimiento; (2) reducción del número de células cancerosas o tumorales; (3) reducción del tamaño del tumor; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células cancerosas en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; y/o (5) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la metástasis.

65 Un cáncer que "no responde a un antagonista específico de Notch1" es un cáncer que no responde al tratamiento con un antagonista específico de Notch1 (en ausencia de cualquier otro antagonista de Notch, es decir, un antagonista de Notch2, Notch3 o Notch4) o que no respondería a dicho tratamiento si se administrara.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o de la célula que se esté tratando, y se puede realizar tanto como profilaxis o en el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o la recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o el alivio del estado patológico y la remisión o un mejor pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o de un trastorno, o para frenar la progresión de una enfermedad o de un trastorno.

5 Un "individuo", "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales de deporte, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un ser humano.

15 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a un preparado que está en una forma que permite la actividad biológica del principio activo para que sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto que reciba la formulación. Dichas formulaciones pueden ser estériles.

20 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

II. REALIZACIONES DE LA INVENCION

25 La presente divulgación se refiere, en parte, a la caracterización de las diferentes clases de LAA-T. Una clase de LAA-T es sensible al tratamiento con GSI, que es un inhibidor pan-Notch, y también es sensible al tratamiento con un antagonista específico de Notch1, lo que indica que Notch1 dirige específicamente esta clase de LAA-T. Otra clase de LAA-T es sensible al tratamiento con GSI, pero insensible (es decir, resistente) al tratamiento con un antagonista específico de Notch1, lo que indica que un receptor Notch alternativo o adicional puede dirigir esta clase de LAA-T. Como se muestra en el presente documento, los inventores han descubierto que esta última clase de LAA-T es parcialmente sensible al tratamiento con un anticuerpo antagonista específico de Notch3, y aún más sensible a una combinación de un anticuerpo antagonista específico de Notch1 y un anticuerpo antagonista específico de Notch3. Estos resultados sugieren un papel tanto para Notch1 como para Notch3 en las leucemias, particularmente, en las leucemias de linfocitos T y de células progenitoras de linfocitos T, tales como LAA-T.

35 A. Métodos de tratamiento

1. Tratamiento del cáncer con un anticuerpo antagonista específico de Notch3, por separado o en combinación con un anticuerpo antagonista específico de Notch1

40 En diversos aspectos de la invención, se proporcionan métodos de tratamiento de un cáncer sensible al GSI, método que comprende administrar a un paciente que tiene dicho cáncer una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch3. En ciertas realizaciones, el cáncer sensible al GSI es leucemia. En ciertas realizaciones, el cáncer sensible al GSI no responde a un anticuerpo antagonista específico de Notch1, por ejemplo, el cáncer tiene niveles de Notch3 activada aumentados de manera significativa y/o el cáncer tiene niveles ausentes o reducidos de Notch1 activada. En una realización adicional, el método comprende además la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch1. A continuación se describen estos y otros aspectos de la invención.

50 En un aspecto particular de la invención, se proporciona un método de tratamiento de una leucemia sensible al GSI que no responde a un anticuerpo antagonista específico de Notch1, comprendiendo el método administrar a un paciente que tiene dicha leucemia una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch3.

Una leucemia sensible al GSI se puede identificar de varias maneras. Por ejemplo, un paciente que tenga leucemia se puede tratar con un GSI para determinar si la leucemia es sensible o no al GSI. Dicho GSI puede incluir cualquier GSI que inhiba significativamente los receptores de Notch. Dicho GSI incluye, pero sin limitación, *t*-butiléster de *N*-[*N*-(3,5-difluorofenacetil)-*L*-alanil]-*S*-fenilglicina (DAPT); dibenzazepina; MK-0752 (Merck); el tripéptido z-Leu-Leu-Nle-CHO (Curry *et al*, *Oncogene* 24: 6333-6344); y cbz-IL-CHO (Weijzen *et al*, *Nat Med* 8:979-986, 2002). Cabe señalar, sin embargo, que no es necesario haber tratado un paciente que tenga leucemia con un GSI para determinar si la leucemia es sensible al GSI. Se pueden emplear otros métodos. Por ejemplo, se pueden evaluar células leucémicas extraídas del paciente para determinar la proliferación o la supervivencia celular en presencia de un GSI tal como cualquiera de los enumerados anteriormente. En un ejemplo adicional, las células leucémicas extraídas del paciente se pueden evaluar para determinar el aumento de la señalización de Notch mediante uno o más receptores de Notch, lo que predeciría que las células son sensibles al GSI. Por ejemplo, las células se pueden evaluar para determinar la presencia de un receptor de Notch mutado, sobreexpresado o activado. Se pueden usar métodos similares a los descritos anteriormente para determinar si cualquier cáncer es sensible al GSI.

Se puede identificar una leucemia (por ejemplo, una leucemia sensible a GSI) como aquella que no responde a un antagonista específico de Notch1 de varios modos. Por ejemplo, se puede tratar un paciente que tenga una leucemia con un anticuerpo antagonista específico de Notch1 para determinar si la leucemia responde o no al anticuerpo antagonista específico de Notch1. En ciertas realizaciones, el antagonista específico de Notch1 al que no responde una leucemia es un anticuerpo antagonista anti-Notch1. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo que se une al dominio extracelular de Notch1 y efectúa la reducción de la señalización de Notch. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo anti-RRN de Notch1. Los anticuerpos anti-RRN de Notch1 incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los anticuerpos anti-RRN de Notch1 desvelados en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2009/0081238 A1. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos anti-RRN de Notch1 que se unen a RRN de Notch1 con una afinidad $\leq 0,1 \mu\text{M}$; anticuerpos anti-RRN de Notch1 que se unen a LNR-A, LNR-B y HD-C de la RRN de Notch1; o una combinación de los anteriores. Los ejemplos de anticuerpos anti-RRN de Notch1 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos A, que comprenden la cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 22; A-1, que comprenden la cadena pesada de SEQ ID NO: 23 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 24; A-2, que comprenden la cadena pesada de SEQ ID NO: 25 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 26; y A-3, que comprenden la cadena pesada de SEQ ID NO: 27 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 28, según lo descrito en el documento US 2009/0081238 A1, o anticuerpos que comprenden las CDR de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado de:

el anticuerpo A (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 34, 35, 36 y 37), el anticuerpo A-1 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 31, 34, 35, 36 y 38), el anticuerpo A-2 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 32, 34, 35, 36 y 39) y el anticuerpo A-3 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 33, 34, 35, 36 y 40). En otra de dichas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo anti-Notch1 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch1. Los ejemplos de dichos anticuerpos se describen en la publicación internacional n.º WO 2008/091641. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-Notch1 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch1 efectúa la reducción de la señalización de Notch1 bloqueando de manera significativa la unión del ligando a Notch1.

Sin embargo, cabe señalar que no es necesario haber tratado a un paciente que tenga leucemia con un antagonista específico de Notch1 para determinar si la leucemia no responde a un antagonista específico de Notch1. Se pueden emplear otros métodos. Por ejemplo, se pueden evaluar células leucémicas extraídas del paciente para determinar la ausencia o la reducción de la activación de Notch1, o en ciertas realizaciones, la presencia de Notch1 de tipo silvestre, lo que predeciría que la leucemia es aquella que no responde a un antagonista específico de Notch1. Por ejemplo, las células se pueden evaluar para determinar la ausencia o la reducción de la señalización de Notch1 mediante la evaluación de la ausencia o de la reducción de la transcripción de genes diana de Notch1, tales como Hey1 y Hey2. En un ejemplo adicional, las células se pueden evaluar para determinar la ausencia o la reducción de la señalización de Notch1 mediante la detección de la ausencia o la reducción de los niveles de una forma activada de Notch1, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo específico de Notch1 activada tal como Val1744 anti-Notch1 activa (disponible en el mercado en Cell Signaling Technologies). En ciertas realizaciones, una célula de comparación adecuada (control positivo) puede ser una célula leucémica que responda a un antagonista específico de Notch1, por ejemplo, una célula leucémica en la que esté activada la vía de Notch1. Dicha célula de comparación puede incluir, por ejemplo, una célula T-ALL en la que se sepa que Notch1 está sobreexpresada, mutada (por ejemplo, que tenga una mutación de activación de Notch1) o activada (por ejemplo, activada constitutivamente), tal como una célula de HPB-ALL. Si las células leucémicas extraídas de un paciente no tienen niveles o tienen niveles reducidos significativamente de Notch1 activada en comparación con la célula de comparación, entonces, la leucemia del paciente es aquella que, presuntamente, no responde a un antagonista específico de Notch1.

Las células leucémicas también se pueden evaluar para determinar la activación de Notch3, lo que indica que la vía de Notch3 está activada y que, por tanto, se prevé que la leucemia sea aquella que no responde a un antagonista específico de Notch1. En una realización, las células leucémicas se pueden examinar para determinar la presencia de Notch3 sobreexpresada, mutada o activada. En ciertas realizaciones, una célula de comparación adecuada (control negativo) a los efectos de evaluar el estado de activación de Notch3 puede ser una célula leucémica que responda a un antagonista específico de Notch1, por ejemplo, una célula leucémica en la que la vía de Notch1 esté activada. Dicha célula de comparación puede incluir, por ejemplo, una célula T-ALL en la que se sepa que Notch1 está sobreexpresada, mutada o activada tal como una célula HPB-ALL. En dicha célula, se espera que Notch3 no esté activada de manera significativa. Por lo tanto, si las células leucémicas extraídas de un paciente tienen niveles aumentados significativamente de Notch3 activada en comparación con la célula de comparación, entonces, la leucemia del paciente, presuntamente, no responde a un antagonista específico de Notch1. En otras ciertas realizaciones, una célula de comparación adecuada (control positivo) puede ser una célula leucémica en la que se sepa que Notch3 está sobreexpresada, mutada o activada, tal como una célula TALL-1. En dicha célula, se espera que Notch3 tenga niveles significativamente aumentados de Notch3 activada. Por lo tanto, si las células leucémicas extraídas de un paciente tienen niveles comparables de Notch3 activada en comparación con la célula de comparación, entonces, la leucemia del paciente es aquella que, presuntamente, no responde a un antagonista específico de Notch1. Se pueden usar métodos similares a los descritos anteriormente para determinar si cualquier cáncer no responde a un antagonista específico de Notch1.

Una herramienta útil para evaluar el estado de activación de Notch3 es el nuevo anticuerpo anti-ICD de Notch3 descrito en los ejemplos, que se une a ICD de Notch3 activada.

En ciertas realizaciones, el antagonista específico de Notch3 que se administra es un anticuerpo que se une al dominio extracelular de Notch3 y efectúa la reducción de la señalización de Notch3. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch3 es un anticuerpo anti-RRN de Notch3. Los anticuerpos anti-RRN de Notch3 incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los anticuerpos anti-RRN de Notch3 desvelados en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2008/0226621 A1. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-RRN de Notch3 que se unen a los dominios LNR-A y HD-C de RRN de Notch3. Los anticuerpos anti-RRN de Notch3 ilustrativos son los anticuerpos monoclonales 256A-4, que comprende las región variable de cadena pesada de SEC ID NO: 5 y la región variable de cadena ligera de SEC ID NO: 6; y 256A-8, que comprende la región variable de cadena pesada de SEC ID NO: 7 y la región variable de cadena ligera de SEC ID NO: 8; según lo descrito en el documento US 2008/0226621 A1, y las formas humanizadas de los mismos, así como los anticuerpos anti-RRN de Notch3 que comprenden las CDR del anticuerpo 256A-4 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 y 14) o 256A-8 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19 y 20). En otra de dichas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-Notch3 es un anticuerpo anti-Notch3 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch3. Los ejemplos de dichos anticuerpos se describen en Li *et al.*, *J. Biol. Chem.* 283: 8046-8054, 2008. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-Notch3 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch3 efectúa la reducción de la señalización de Notch3 bloqueando de manera significativa la unión del ligando a Notch3.

En ciertas realizaciones, una leucemia es una leucemia de linfocitos T. En algunas de dichas realizaciones, una leucemia de linfocitos T es una leucemia de células progenitoras de linfocitos T. En algunas de dichas realizaciones, una leucemia de células progenitoras de linfocitos T es LAA-T.

En realizaciones adicionales, se proporciona un método de tratamiento de un cáncer sensible a GSI que no responde a un anticuerpo antagonista específico de Notch1, comprendiendo el método administrar a un paciente que tiene dicho cáncer una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch3, y comprendiendo además administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch1. En ciertas realizaciones, el cáncer sensible a GSI es una leucemia sensible a GSI. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo antagonista específico de Notch1 es un anticuerpo que se une al dominio extracelular de Notch1 y efectúa la reducción de la señalización de Notch1. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo anti-RRN de Notch1. Los anticuerpos anti-RRN de Notch1 incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los anticuerpos anti-RRN de Notch1 desvelados en la publicación de solicitud de EE.UU. n.º US 2009/0081238 A1. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos anti-RRN de Notch1 que se unen a RRN de Notch1 con una afinidad $\leq 0,1 \mu\text{M}$; anticuerpos anti-RRN de Notch1 que se unen a LNR-A, LNR-B y HD-C de la RRN de Notch1; o una combinación de los anteriores. Los ejemplos de anticuerpos anti-RRN de Notch1 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos A, que comprenden la cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 22; A-1, que comprenden la cadena pesada de SEQ ID NO: 23 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 24; A-2, que comprenden la cadena pesada de SEQ ID NO: 25 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 26; y A-3, que comprenden la cadena pesada de SEQ ID NO: 27 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 28, según lo descrito en el documento US 2009/0081238 A1, o anticuerpos que comprenden las CDR de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado de:

el anticuerpo A (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 34, 35, 36 y 37),
 el anticuerpo A-1 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 31, 34, 35, 36 y 38),
 el anticuerpo A-2 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 32, 34, 35, 36 y 39) y
 el anticuerpo A-3 (que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 33, 34, 35, 36 y 40). En otra de dichas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo anti-Notch1 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch1. Los ejemplos de dichos anticuerpos se describen en la publicación internacional n.º WO 2008/091641. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-Notch1 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch1 efectúa la reducción de la señalización de Notch1 bloqueando de manera significativa la unión del ligando a Notch1

2. Tratamiento de la leucemia con un anticuerpo antagonista específico de Notch1

Otros aspectos de la invención se basan, en parte, en la identificación de una clase de LLA-T que sea sensible a GSI y que también sea sensible a un antagonista específico de Notch1, pero que no sea sensible a un antagonista específico de Notch3, lo que indica que Notch1 dirige la LAA-T. En diversos aspectos de la divulgación, se proporcionan métodos de tratamiento de un cáncer sensible a GSI, comprendiendo el método administrar a un paciente que tenga dicho cáncer una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch1. En ciertos aspectos de la divulgación, el cáncer sensible a GSI es la leucemia. En ciertos aspectos de la divulgación, el cáncer sensible a GSI no responde a un antagonista específico de Notch3, por ejemplo, el cáncer no tiene niveles o tiene niveles reducidos de Notch3 activada (por ejemplo, en comparación con una célula de comparación que responde a un antagonista específico de Notch3) y/o tiene niveles aumentados de manera significativa de Notch1 activada (por ejemplo, en comparación con una célula de comparación que no responde a un antagonista específico de Notch1).

En ciertos aspectos de la divulgación, la leucemia pertenece a una clase de leucemias caracterizadas por la sensibilidad a GSI y la sensibilidad a un antagonista específico de Notch1. En ciertos aspectos de la divulgación, la leucemia es una leucemia de linfocitos T. En uno de dichos aspectos, la leucemia de linfocitos T es una leucemia de células progenitoras de linfocitos T. En uno de dichos aspectos, la leucemia de linfocitos T es LAA-T. En otra realización, la leucemia se caracteriza por una mutación de activación de Notch1.

En ciertos aspectos de la divulgación, un antagonista específico de Notch1 es cualquiera de los proporcionados anteriormente. En aspectos adicionales de la divulgación, un antagonista específico de Notch3 es cualquiera de los proporcionados anteriormente.

B. Composiciones y métodos de diagnóstico

La divulgación proporciona además un anticuerpo que se une a la ICD de la Notch3 humana activada. En una realización, el anticuerpo se une a la secuencia peptídica VMVARRKREHSTLW (SEQ ID NO: 4). En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo es monoclonal. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo es policlonal. Los aspectos anteriores de la divulgación pueden estar presentes solos o en combinación.

Dicho anticuerpo es útil en métodos de diagnóstico, por ejemplo, para identificar poblaciones de pacientes adecuadas para el tratamiento con un antagonista específico de Notch3, como se describe anteriormente. Por consiguiente, en ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de identificación de un cáncer adecuado para el tratamiento con un antagonista de Notch3, comprendiendo el método determinar si Notch3 se activa en el cáncer. En un aspecto de la divulgación, el cáncer es un cáncer sensible a GSI. En otro aspecto de la divulgación, el cáncer es una leucemia. En otro aspecto de la divulgación, la leucemia es una leucemia de linfocitos T. En uno de dichos aspectos, la leucemia de linfocitos T es una leucemia de células progenitoras de linfocitos T. En una de dichas realizaciones, la leucemia de linfocitos T es LAA-T.

En aspectos adicionales de la divulgación, la determinación de si Notch3 se activa en el cáncer comprende poner en contacto una muestra del cáncer con un anticuerpo que se une a la ICD de Notch3 activada, y determinar si hay niveles de Notch3 activada aumentados significativamente (como se refleja en los niveles de ICD de Notch3 activada) presentes, en el que la presencia de niveles aumentados de manera significativa de Notch3 activada indica que el cáncer es adecuado para el tratamiento con un antagonista de Notch3. Para determinar si hay niveles de Notch3 activada aumentados significativamente presentes en la muestra, un comparador apropiado (control positivo) puede ser, por ejemplo, una muestra de un cáncer que se sabe que responde a un antagonista de Notch3. Si la muestra de "ensayo" y la muestra de "control" contienen niveles comparables de Notch3 activada, entonces el cáncer del que se obtuvo la muestra de "ensayo" es adecuado para el tratamiento con un antagonista de Notch3. Otro comparador apropiado (control negativo) puede ser, por ejemplo, una muestra de un cáncer que no responda a un antagonista de Notch3. Si la muestra de "ensayo" contiene niveles aumentados significativamente de Notch3 activada en comparación con la muestra de control, entonces el cáncer del que se obtuvo la muestra de "ensayo" es adecuado para el tratamiento con un antagonista de Notch3.

En ciertos aspectos de los métodos anteriores, un antagonista de Notch3 es un antagonista específico de Notch3. En ciertos aspectos, un antagonista específico de Notch3 es cualquiera de los descritos anteriormente.

III. EJEMPLOS

A. LLA-T se divide en tres clases

Estudios anteriores han demostrado que las líneas celulares de LAA-T pueden ser sensibles o insensibles al tratamiento con GSI. Por ejemplo, ciertas líneas celulares de LAA-T son resistentes a GSI a pesar de la expresión de mutaciones de activación de Notch1, posiblemente debido a la activación de una vía no Notch, por ejemplo, una vía que evita la necesidad de Notch. (Véase, por ejemplo, Palomero *et al.*, *Nat Med* 13:1203-1210, 2007). Sin embargo, en un estudio, cinco de treinta líneas celulares de LAA-T fueron sensibles a GSI, demostrando la detención del ciclo celular en respuesta a GSI. (Véase Weng *et al.*, *Science*, 306:269-271, 2004). Los estudios que se presentan a continuación exploran aún más la respuesta de las líneas celulares de LAA-T no solo hacia GSI, sino también hacia antagonistas específicos de Notch1 y de Notch3.

Se caracterizaron tres clases de LAA-T en función de su sensibilidad al GSI y un antagonista específico de Notch1. El antagonista específico de Notch1 usado en los siguientes estudios fue el anticuerpo anti-RRN de Notch1, "Anticuerpo A-2", cuyo aislamiento y cuya caracterización se describen en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2009/0081238 A1. Para mayor comodidad, el "Anticuerpo A-2" se denomina en el presente documento "anti-RRN1", y también se conoce como "α-Notch1", "aNotch1" o "α-N1" en las figuras.

Las Figuras 3-5 presentan la clasificación de tres líneas celulares de LAA-T humanas representativas. Esas líneas celulares incluyen la línea celular P-12 Ichikawa, la línea celular HPB-ALL y la línea celular TALL-1. Se cultivaron las células durante ocho días en condiciones de control (DMSO solo (el vehículo para DAPT) o anti-gD (un anticuerpo de control del isotipo)); en presencia del inhibidor de gamma-secretasa, DAPT (5 µM); o en presencia de anti-RRN1

(5 µg/ml). Se fijaron las células, se tiñeron con yoduro de propidio y se prepararon para FACS para analizar el estado del ciclo celular de acuerdo con procedimientos convencionales. Se examinó la sensibilidad del crecimiento examinando si un tratamiento dado causaba un aumento del porcentaje de células en G0/G1 con la correspondiente reducción del porcentaje de células en S/G2/M. Los resultados muestran que las células P-12 Ichikawa son resistentes tanto a DAPT como a anti-RRN1 (Figura 3A-3D), sin diferencia significativa en el estado del ciclo celular entre las células tratadas con DAPT, las tratadas con anti-RRN1 y las de control (tratadas con DMSO y anti-gD). Las células HPB-ALL son sensibles tanto a DAPT como a anti-RRN1 (Figura 4A-4D), mostrando las células tratadas con DAPT y con anti-RRN1 aproximadamente el 78 % y el 76 % de las células en G0/G1, respectivamente, en comparación con aproximadamente el 33-34 % de las células de control. Las células TALL-1 son sensibles a DAPT, pero resistentes a anti-RRN1 (Figura 5A-5D), con aproximadamente el 87 % de las células tratadas con DAPT en G0/G1, en comparación con aproximadamente el 55 % de las células tratadas con anti-RRN1 y aproximadamente el 53-54% de las células de control. Cabe señalar que Notch1 no está mutada en las células TALL-1. Estudios posteriores revelaron que una cuarta línea celular, CCRF-CEM, pasó a pertenecer a la misma clase que las células P-12 Ichikawa (es decir, resistentes a GSI y anti-RRN1). (Datos no presentados y Figura 10).

Como se muestra en la Figura 6, las mediciones del tamaño celular reflejan estas tres clases de LAA-T. Se cultivaron la línea celular P-12 Ichikawa, la línea celular HPB-ALL y la línea celular TALL-1 durante aproximadamente una semana en condiciones de control (DMSO solo (el vehículo para DAPT) o anti-gD (un anticuerpo de control del isotipo)); en presencia del inhibidor de gamma-secretasa, DAPT (5 µM); o en presencia de anti-RRN1 (5 µg/ml). Se midió el diámetro celular usando un contador de células (Vi-Cell, Beckman Coulter). De acuerdo con los estudios de inhibición del crecimiento, la línea P-12 Ichikawa es resistente tanto a DAPT como a anti-RRN1, como se indica por el diámetro celular relativamente constante entre las células tratadas y de control. HPB-ALL es sensible tanto a DAPT como a anti-RRN1, como se indica por el tamaño significativamente menor de las células tratadas con estos agentes, respectivamente. TALL-1 es sensible a DAPT, pero resistente a anti-RRN1, como se indica por el tamaño significativamente menor de las células tratadas con DAPT, pero no con anti-RRN1 o agentes de control. Estos resultados coinciden con los estudios de crecimiento descritos anteriormente.

Como se muestra en la Figura 7, las mediciones de la apoptosis también reflejan estas tres clases de LAA-T. Se trataron la línea celular P-12 Ichikawa, la línea celular HPB-ALL y la línea celular TALL-1 como se ha descrito anteriormente para la Figura 6. Las células se analizaron mediante FACS, usando tinción con 7-AAD (marcador de la muerte celular) en el eje X de la Figura 7, y tinción con Anexina V (marcador de la apoptosis) en el eje Y de la Figura 7. Basándose en el porcentaje de células de la población doble positiva, el tratamiento bien con DAPT o con anti-RRN1 aumenta la muerte celular apoptótica en las células HPB-ALL. Por el contrario, las células P-12 Ichikawa son resistentes a ambos tratamientos, mientras que las células TALL-1 son sensibles a DAPT, pero no a anti-RRN1. Estos resultados coinciden con los estudios del crecimiento y las mediciones del diámetro celular que se han descrito anteriormente.

Como se muestra en la Figura 8, los resultados de un ensayo de proliferación celular también reflejan estas tres clases de LAA-T. Se trataron la línea celular P-12 Ichikawa, la línea celular HPB-ALL y la línea celular TALL-1 como se ha descrito anteriormente para la Figura 6. Las células se analizaron mediante FACS, usando tinción con Ki-67 para marcar la proliferación (panel de la izquierda). Un cambio en el pico de FACS hacia la izquierda indica una menor tinción para Ki-67 y la reducción de la proliferación, y por el contrario, un cambio en el pico de FACS hacia la derecha indica una mayor tinción para Ki-67 y un aumento de la proliferación. Basándose en este ensayo de proliferación, HPB-ALL fue sensible tanto a DAPT como a anti-RRN1, TALL-1 fue sensible a DAPT, pero no a anti-RRN1 y las células P-12 Ichikawa fueron resistentes a ambos. Una vez más, estos resultados coinciden con los de los otros ensayos descritos anteriormente, así como con las mediciones de la apoptosis que se muestran en el panel derecho de la Figura 8. Ese panel muestra los recuentos de células para las células doble negativas en anexina V/7-AAD (no apoptóticas). Los recuentos bajos de células (es decir, números bajos de células doble negativas en Anexina V/7-AAD (no apoptóticas) indican un aumento de la apoptosis, que a su vez se correlaciona con la reducción de la proliferación en el panel de la izquierda.

B. Las células TALL-1 sensibles a GSI y resistentes a anti-RRN1 son parcialmente sensibles a anti-RRN3

Como se ha descrito anteriormente, dos de las tres clases de LLA-T, representadas por HPB-ALL y TALL-1, son ambas sensibles a GSI, pero se diferencian en que la primera es sensible a anti-RRN1, mientras que la segunda no lo es. Dado que la sensibilidad a GSI sugiere un papel para uno o más receptores de Notch, los presentes inventores se preguntaban si un receptor de Notch, además de o como alternativa a Notch1, desempeñaba un papel en la resistencia de la segunda clase de LAA-T a anti-RRN de Notch1. Para abordar esta cuestión, se trataron células CCRF-CEM, células HPB-ALL y células TALL-1 como se ha descrito para las Figuras 3-5, a excepción de la inclusión adicional de un antagonista específico de Notch3 a 10 µg/ml en un subconjunto de tratamientos para ensayar si el crecimiento dependía de la señalización de Notch3. El antagonista específico de Notch3 usado en estos estudios fue anticuerpo monoclonal de ratón anti-Notch3 humana 256A-4, cuyo aislamiento y cuya caracterización se describen en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2008/0226621 A1. Por comodidad, 256A-4 se denomina en el presente documento "anti-RRN3", y también se conoce como "α-N3" en las figuras.

Los resultados indican que el crecimiento de TALL-1 es parcialmente sensible a anti-RRN3 y aún más sensible a anti-RRN1 más anti-RRN3 (véase la Figura 9A-9F), lo que sugiere que la señalización a través de Notch3, así como Notch1 explica por qué la línea es sensible a DAPT, pero no a anti-RRN1. En concreto, casi el 83 % de las células TALL-1 estaban en G0/G1 después del tratamiento con DAPT, en comparación con aproximadamente el 53-54 % para las células de control (tratadas con DMSO o α -gd). El tratamiento con anti-RRN3 produjo aproximadamente un 61 % de las células en G0/G1, y la adición de anti-RRN1 aumentó esta cifra hasta aproximadamente el 68 %. Por el contrario, CCRF-CEM parece resistente a todos los tratamientos ensayados (Figura 10A-10F), mostrando cada uno aproximadamente el 52-57 % de las células en G0/G1. HBP-ALL parece sensible tanto al tratamiento con DAPT como el tratamiento con anti-RRN1 (mostrando cada uno aproximadamente el 67 % de las células en G0/G1), pero no el tratamiento con anti-RRN3 (mostrando aproximadamente el 37 % de células en G0/G1) (Figura 11A-11F).

Los resultados del experimento anterior en la Figura 9B-9F se vuelven a representar en la Figura 14. Los cultivos de células TALL-1 comenzaron con aproximadamente 5×10^5 células/ml, y el eje Y es el número de células/ml, en millones de células, después del tratamiento en las condiciones indicadas y como se describe para la Figura 9B-9F. La Figura 14 muestra que anti-RRN1 y anti-RRN3, cada uno individualmente, produjo un menor recuento de células. Sin embargo, la combinación de anti-RRN1 y anti-RRN3 tuvo un efecto más pronunciado en la reducción de los recuentos de células, acercándose a los niveles observados con DAPT.

C. Notch3 se activa en las células sensibles a anti-RRN3

Para investigar el estado de activación de Notch3 en las tres clases de LLA-T, se desarrolló un nuevo anticuerpo anti-ICD de Notch3 que reconoce la ICD de Notch3 escindida (es decir, activada). Usando procedimientos convencionales, se generaron anticuerpos policlonales de conejo contra un péptido correspondiente al extremo N-terminal de la ICD de Notch3, que se esperaba que se produjera de la escisión por la gamma-secretasa en el sitio de S3. La secuencia peptídica usada fue: VMVARRKREHSTLW (SEQ ID NO: 4). El péptido se conjugó a BSA para las inmunizaciones. Los anticuerpos policlonales se purificaron en una columna de proteína A y luego se usaron para la inmunotransferencia, como se muestra en la Figura 12. Para ensayar si el anticuerpo reconoció la ICD de Notch3 nuclear, escindida, se usó la línea celular de cáncer de mama basal MDA-MB-468. Esta línea expresa altos niveles de Notch3. Las células se trataron con Jag1 inmovilizado (R&D Systems) (o Fc como control) para inducir la señalización de Notch, y se aislaron fracciones citoplasmáticas (C) y nucleares (N) en los puntos temporales indicados después de la inducción. Como control para examinar el nivel de ICD de Notch3 presente sin inducción de Jag1, se trataron las células que no se indujeron con DAPT (5 μ M), DMSO (vehículo para DAPT) o el inhibidor del proteasoma MG132 para estabilizar la ICD de Notch3, como se indica. CREB y tubulina sirvieron como marcadores de proteínas nucleares y citoplasmáticas, respectivamente. Los resultados de la Figura 12 muestran que el anticuerpo anti-ICD de Notch3 reconoce una banda del tamaño esperado que se localiza en el núcleo y que fue inducida por Jag1.

A continuación, se usó este nuevo anticuerpo anti-ICD de Notch3 para investigar el estado de activación de Notch3 en las tres clases de LAA-T. Como se muestra en la Figura 13, se inmunotransfirieron las fracciones nucleares de las células P12-Ichikawa, HPB-ALL y TALL-1 con Val1744 anti-Notch1, un anticuerpo policlonal disponible en el mercado que reconoce la ICD de Notch1 activada, escindida, (Cell Signaling Technologies) (panel superior) o con el anticuerpo anti-ICD de Notch3 (ICD de α -N3 Y935, panel inferior). Las células 3T3 que expresan Notch1 (3T3-N1) y MDA-MB-468 (MB468) se usaron como controles. De acuerdo con los estudios de inhibición del crecimiento descritos en las figuras anteriores, TALL-1 expresa altos niveles de Notch3 activada, pero no de Notch1 activada (compárense los carriles de TALL-1 de los paneles inferior y superior, respectivamente). Además, la producción de Notch3 activada en TALL-1 pudo ser bloqueada por DAPT, pero no por anti-RRN1 (panel inferior). Por otra parte, como se esperaba, las células HPB-ALL expresan altos niveles de Notch1 activada, que pueden ser bloqueados por DAPT o anticuerpo anti-RRN1 (véanse los carriles HPB-ALL del panel superior). En cuanto a los controles, la Notch1 activada se observa como una banda más ligera, desplazada hacia arriba en las células 3T3-N1 tratadas con Jagged (+jag) (panel superior). Además, se observa Notch3 activada como una banda débil, pero detectable, en las células MDA-MB-468 tratadas con un anticuerpo agonista anti-Notch3 (A13, que se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2008/0118520 A1 como 256A-13) en ausencia de DAPT (panel inferior).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. SIEBEL, Christian W.

<120> MÉTODOS PARA TRATAR CÁNCER USANDO ANTAGONISTAS NOTCH

<130> P4371R1 WO

<140> EP 10762827.3

<141> 29-09-2010

<150> 61/247.298

<151> 30-09-2009

<160> 40
 <170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 2555
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

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

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

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

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

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

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

Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Thr 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 Ala

ES 2 580 229 T3

145					150						155					160
Ser	Tyr	Ile	Cys	His	Cys	Pro	Pro	Ser	Phe	His	Gly	Pro	Thr	Cys	Arg	
				165					170					175		
Gln	Asp	Val	Asn	Glu	Cys	Gly	Gln	Lys	Pro	Gly	Leu	Cys	Arg	His	Gly	
			180					185					190			
Gly	Thr	Cys	His	Asn	Glu	Val	Gly	Ser	Tyr	Arg	Cys	Val	Cys	Arg	Ala	
		195					200					205				
Thr	His	Thr	Gly	Pro	Asn	Cys	Glu	Arg	Pro	Tyr	Val	Pro	Cys	Ser	Pro	
	210					215					220					
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Arg	Pro	Thr	Gly	Asp	Val	Thr	
225					230						235				240	
His	Glu	Cys	Ala	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gln	Asn	Cys	Glu	Glu	
				245					250					255		
Asn	Ile	Asp	Asp	Cys	Pro	Gly	Asn	Asn	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Ala	Cys	
			260					265					270			
Val	Asp	Gly	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Cys	Arg	Cys	Pro	Pro	Glu	Trp	Thr	
		275					280					285				
Gly	Gln	Tyr	Cys	Thr	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Gln	Leu	Met	Pro	Asn	
	290					295					300					
Ala	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asn	Thr	His	Gly	Gly	Tyr	Asn	
305					310					315					320	
Cys	Val	Cys	Val	Asn	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Asp	Cys	Ser	Glu	Asn	Ile	
				325					330					335		
Asp	Asp	Cys	Ala	Ser	Ala	Ala	Cys	Phe	His	Gly	Ala	Thr	Cys	His	Asp	
			340					345					350			
Arg	Val	Ala	Ser	Phe	Tyr	Cys	Glu	Cys	Pro	His	Gly	Arg	Thr	Gly	Leu	
		355					360					365				
Leu	Cys	His	Leu	Asn	Asp	Ala	Cys	Ile	Ser	Asn	Pro	Cys	Asn	Glu	Gly	
	370					375					380					
Ser	Asn	Cys	Asp	Thr	Asn	Pro	Val	Asn	Gly	Lys	Ala	Ile	Cys	Thr	Cys	
385					390					395					400	

ES 2 580 229 T3

Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
 405 410 415

Ser Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Ile Asn Thr
 420 425 430

Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg
 435 440 445

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

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

Gln Cys Glu Cys Pro Thr Gly Phe Thr 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

Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Arg
 580 585 590

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

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

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

Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Ser 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 Ile Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Asn Pro Cys His
 675 680 685
 Asn Gly Gly Thr Cys Glu Asp Gly Ile Asn 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
 Asn Ser Asn Pro Cys Val His Gly Ala Cys Arg Asp Ser Leu Asn Gly
 725 730 735
 Tyr Lys Cys Asp Cys Asp 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 Leu Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Cys Glu Val Val Leu Ala Pro
 820 825 830
 Cys Ala Pro Ser Pro Cys Arg Asn Gly Gly Glu Cys Arg Gln 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 Val Asp Ile Asn Glu Cys Val Leu Ser Pro Cys Arg His
 865 870 875 880
 Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr His Gly Gly Tyr Arg Cys His Cys Gln
 885 890 895
 Ala Gly Tyr Ser Gly Arg Asn Cys Glu Thr Asp Ile Asp Asp Cys Arg
 900 905 910

ES 2 580 229 T3

Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Gly Ile Asn Thr
 915 920 925

Ala Phe Cys Asp Cys Leu Pro Gly Phe Arg Gly Thr Phe Cys Glu Glu
 930 935 940

Asp Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asp Pro Cys Arg Asn Gly Ala Asn Cys
 945 950 955 960

Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser
 965 970 975

Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys
 980 985 990

Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Le
 995 1000 1005

Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln His Asp Val Asn
 1010 1015 1020

Glu Cys Asp Ser Gln Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp
 1025 1030 1035

Gly Cys Gly Ser Tyr Arg Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly
 1040 1045 1050

Pro Asn Cys Gln Asn Leu Val His Trp Cys Asp Ser Ser Pro Cys
 1055 1060 1065

Lys Asn Gly Gly Lys Cys Trp Gln Thr His Thr Gln Tyr Arg Cys
 1070 1075 1080

Glu Cys Pro Ser Gly Trp Thr Gly Leu Tyr Cys Asp Val Pro Ser
 1085 1090 1095

Val Ser Cys Glu Val Ala Ala Gln Arg Gln Gly Val Asp Val Ala
 1100 1105 1110

Arg Leu Cys Gln His Gly Gly Leu Cys Val Asp Ala Gly Asn Thr
 1115 1120 1125

His His Cys Arg Cys Gln Ala Gly Tyr Thr Gly Ser Tyr Cys Glu
 1130 1135 1140

Asp Leu Val Asp Glu Cys Ser Pro Ser Pro Cys Gln Asn Gly Ala

ES 2 580 229 T3

1145						1150						1155			
Thr Cys	Thr Asp	Tyr Leu	Gly	Gly Tyr	Ser Cys	Lys	Cys Val	Ala							
1160			1165			1170									
Gly Tyr	His Gly	Val Asn	Cys	Ser Glu	Glu Ile	Asp	Glu Cys	Leu							
1175			1180			1185									
Ser His	Pro Cys	Gln Asn	Gly	Gly Thr	Cys Leu	Asp	Leu Pro	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	Asn Pro	Pro Val	Asp	Pro Val	Ser							
1220			1225			1230									
Arg Ser	Pro Lys	Cys Phe	Asn	Asn Gly	Thr Cys	Val	Asp Gln	Val							
1235			1240			1245									
Gly Gly	Tyr Ser	Cys Thr	Cys	Pro Pro	Gly Phe	Val	Gly Glu	Arg							
1250			1255			1260									
Cys Glu	Gly Asp	Val Asn	Glu	Cys Leu	Ser Asn	Pro	Cys Asp	Ala							
1265			1270			1275									
Arg Gly	Thr Gln	Asn Cys	Val	Gln Arg	Val Asn	Asp	Phe His	Cys							
1280			1285			1290									
Glu Cys	Arg Ala	Gly His	Thr	Gly Arg	Arg Cys	Glu	Ser Val	Ile							
1295			1300			1305									
Asn Gly	Cys Lys	Gly Lys	Pro	Cys Lys	Asn Gly	Gly	Thr Cys	Ala							
1310			1315			1320									
Val Ala	Ser Asn	Thr Ala	Arg	Gly Phe	Ile Cys	Lys	Cys Pro	Ala							
1325			1330			1335									
Gly Phe	Glu Gly	Ala Thr	Cys	Glu Asn	Asp Ala	Arg	Thr Cys	Gly							
1340			1345			1350									
Ser Leu	Arg Cys	Leu Asn	Gly	Gly Thr	Cys Ile	Ser	Gly Pro	Arg							
1355			1360			1365									
Ser Pro	Thr Cys	Leu Cys	Leu	Gly Pro	Phe Thr	Gly	Pro Glu	Cys							
1370			1375			1380									

ES 2 580 229 T3

Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Leu Gly Gly Asn Pro Cys Tyr
1385 | 1390 1395

Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Ser Pro Phe Tyr Arg
1400 1405 1410

Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu
1415 1420 1425

Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro
1430 1435 1440

Leu Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala
1445 1450 1455

Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly
1460 1465 1470

Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys
1475 1480 1485

Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly
1490 1495 1500

His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly
1505 1510 1515

Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp
1520 1525 1530

Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly
1535 1540 1545

Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu
1550 1555 1560

His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val Val
1565 1570 1575

Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
1580 1585 1590

Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg
1595 1600 1605

Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu
1610 1615 1620

ES 2 580 229 T3

Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	His	Pro	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Glu	Gly	Trp
1625						1630					1635			
Ala	Ala	Pro	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Gln	Val	Lys	Ala	Ser	Leu	Leu
1640						1645					1650			
Pro	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Arg	Arg	Arg	Arg	Glu	Leu	Asp	Pro
1655						1660					1665			
Met	Asp	Val	Arg	Gly	Ser	Ile	Val	Tyr	Leu	Glu	Ile	Asp	Asn	Arg
1670						1675					1680			
Gln	Cys	Val	Gln	Ala	Ser	Ser	Gln	Cys	Phe	Gln	Ser	Ala	Thr	Asp
1685						1690					1695			
Val	Ala	Ala	Phe	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Asn
1700						1705					1710			
Ile	Pro	Tyr	Lys	Ile	Glu	Ala	Val	Gln	Ser	Glu	Thr	Val	Glu	Pro
1715						1720					1725			
Pro	Pro	Pro	Ala	Gln	Leu	His	Phe	Met	Tyr	Val	Ala	Ala	Ala	Ala
1730						1735					1740			
Phe	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Ser	Arg
1745						1750					1755			
Lys	Arg	Arg	Arg	Gln	His	Gly	Gln	Leu	Trp	Phe	Pro	Glu	Gly	Phe
1760						1765					1770			
Lys	Val	Ser	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Glu	Pro	Leu	Gly
1775						1780					1785			
Glu	Asp	Ser	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Lys	Asn	Ala	Ser	Asp	Gly
1790						1795					1800			
Ala	Leu	Met	Asp	Asp	Asn	Gln	Asn	Glu	Trp	Gly	Asp	Glu	Asp	Leu
1805						1810					1815			
Glu	Thr	Lys	Lys	Phe	Arg	Phe	Glu	Glu	Pro	Val	Val	Leu	Pro	Asp
1820						1825					1830			
Leu	Asp	Asp	Gln	Thr	Asp	His	Arg	Gln	Trp	Thr	Gln	Gln	His	Leu
1835						1840					1845			
Asp	Ala	Ala	Asp	Leu	Arg	Met	Ser	Ala	Met	Ala	Pro	Thr	Pro	Pro
1850						1855					1860			

ES 2 580 229 T3

Gln Gly Glu Val Asp Ala Asp Cys Met Asp Val Asn Val Arg Gly
 1865 1870 1875

Pro Asp Gly Phe Thr Pro Leu Met Ile Ala Ser Cys Ser Gly Gly
 1880 1885 1890

Gly Leu Glu Thr Gly Asn Ser Glu Glu Glu Glu Asp Ala Pro Ala
 1895 1900 1905

Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr Gln Gly Ala Ser Leu His Asn Gln
 1910 1915 1920

Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr
 1925 1930 1935

Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu Glu Ala Ser Ala Asp
 1940 1945 1950

Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr Pro Leu His Ala Ala
 1955 1960 1965

Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln Ile Leu Ile Arg Asn
 1970 1975 1980

Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His Asp Gly Thr Thr Pro
 1985 1990 1995

Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Leu Glu Asp
 2000 2005 2010

Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Asp Leu Gly
 2015 2020 2025

Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Asp Ala
 2030 2035 2040

Ala Val Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn Lys Asp Met Gln Asn
 2045 2050 2055

Asn Arg Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser
 2060 2065 2070

Tyr Glu Thr Ala Lys Val Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp
 2075 2080 2085

Ile Thr Asp His Met Asp Arg Leu Pro Arg Asp Ile Ala Gln Glu

ES 2 580 229 T3

2090						2095						2100		
Arg	Met	His	His	Asp	Ile	Val	Arg	Leu	Leu	Asp	Glu	Tyr	Asn	Leu
2105						2110					2115			
Val	Arg	Ser	Pro	Gln	Leu	His	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro
2120						2125					2130			
Thr	Leu	Ser	Pro	Pro	Leu	Cys	Ser	Pro	Asn	Gly	Tyr	Leu	Gly	Ser
2135						2140					2145			
Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Lys	Lys	Val	Arg	Lys	Pro	Ser	Ser
2150						2155					2160			
Lys	Gly	Leu	Ala	Cys	Gly	Ser	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp	Leu	Lys	Ala
2165						2170					2175			
Arg	Arg	Lys	Lys	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	Ser
2180						2185					2190			
Ser	Gly	Met	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	Ser	Leu	Glu	Ser	Pro	His	Gly
2195						2200					2205			
Tyr	Leu	Ser	Asp	Val	Ala	Ser	Pro	Pro	Leu	Leu	Pro	Ser	Pro	Phe
2210						2215					2220			
Gln	Gln	Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Leu	Asn	His	Leu	Pro	Gly	Met	Pro
2225						2230					2235			
Asp	Thr	His	Leu	Gly	Ile	Gly	His	Leu	Asn	Val	Ala	Ala	Lys	Pro
2240						2245					2250			
Glu	Met	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Leu	Ala	Phe	Glu	Thr
2255						2260					2265			
Gly	Pro	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Leu	Pro	Val	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser
2270						2275					2280			
Thr	Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Asn	Phe	Thr	Val
2285						2290					2295			
Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Leu	Asn	Gly	Gln	Cys	Glu	Trp	Leu	Ser	Arg
2300						2305					2310			
Leu	Gln	Ser	Gly	Met	Val	Pro	Asn	Gln	Tyr	Asn	Pro	Leu	Arg	Gly
2315						2320					2325			

ES 2 580 229 T3

Ser Val Ala Pro Gly Pro Leu Ser Thr Gln Ala Pro Ser Leu Gln
 2330 2335 2340

His Gly Met Val Gly Pro Leu His Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ala
 2345 2350 2355

Leu Ser Gln Met Met Ser Tyr Gln Gly Leu Pro Ser Thr Arg Leu
 2360 2365 2370

Ala Thr Gln Pro His Leu Val Gln Thr Gln Gln Val Gln Pro Gln
 2375 2380 2385

Asn Leu Gln Met Gln Gln Gln Asn Leu Gln Pro Ala Asn Ile Gln
 2390 2395 2400

Gln Gln Gln Ser Leu Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro His
 2405 2410 2415

Leu Gly Val Ser Ser Ala Ala Ser Gly His Leu Gly Arg Ser Phe
 2420 2425 2430

Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val Gln Pro Leu Gly Pro
 2435 2440 2445

Ser Ser Leu Ala Val His Thr Ile Leu Pro Gln Glu Ser Pro Ala
 2450 2455 2460

Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Pro Val Thr Ala
 2465 2470 2475

Ala Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His Ser Tyr Ser Ser Pro
 2480 2485 2490

Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu Gln Val Pro Glu His Pro
 2495 2500 2505

Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser
 2510 2515 2520

Ser Pro His Ser Asn Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly Val Ser Ser
 2525 2530 2535

Pro Pro Thr Ser Met Gln Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu Ala
 2540 2545 2550

Phe Lys
 2555

ES 2 580 229 T3

<210> 2
 <211> 2531
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 2

Met Pro Arg Leu Leu Thr 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 Ser Asn Pro Cys Leu
 50 55 60
 Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp His Gly
 65 70 75 80
 Gly Thr Val Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Pro Leu Gly Phe Ser Gly Pro
 85 90 95
 Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp 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 Arg 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
 180 185 190
 Gly Thr Cys His Asn Glu Ile Gly Ser Tyr Arg Cys Ala Cys Arg Ala
 195 200 205
 Thr His Thr Gly Pro His Cys Glu Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro
 210 215 220

ES 2 580 229 T3

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Thr Thr
 225 230 235 240

His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Gln Asn Cys Glu Glu
 245 250 255

Asn Val Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys
 260 265 270

Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr
 275 280 285

Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn
 290 295 300

Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn
 305 310 315 320

Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile
 325 330 335

Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe Gln Gly Ala Thr Cys His Asp
 340 345 350

Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu
 355 360 365

Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly
 370 375 380

Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys
 385 390 395 400

Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
 405 410 415

Ala Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Leu Asn Thr
 420 425 430

Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg
 435 440 445

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

ES 2 580 229 T3

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 His Cys Met Asp Lys Ile Asn Glu Phe
 500 505 510

Gln Cys Gln Cys Pro Lys Gly Phe Asn 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

Tyr Gly Ser 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 Ser
 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

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	Val	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	Ile	Asn	Thr	
		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	Ser	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	Val	Gly	Phe	Asn	
				965					970					975		

ES 2 580 229 T3

Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys
 980 985 | 990

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 Arg Cys Trp Gln Thr Asn Thr Gln Tyr His Cys
 1070 1075 1080

Glu Cys Arg Ser Gly Trp Thr Gly Val 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 Gly 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

Ser Tyr Lys Cys Ser Cys Pro Arg Gly Thr Gln Gly Val His Cys
 1205 1210 1215

ES 2 580 229 T3

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
 1235 1240 1245

Gly Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Glu Arg
 1250 1255 1260

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

Arg Gly Thr Gln Asn Cys Val Gln Arg Val Asn Asp Phe His Cys
 1280 1285 1290

Glu Cys Arg Ala Gly His Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Val Ile
 1295 1300 1305

Asn Gly Cys Arg Gly Lys Pro Cys Lys Asn Gly Gly Val Cys Ala
 1310 1315 1320

Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe Ile Cys Arg Cys Pro Ala
 1325 1330 1335

Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp Ala Arg Thr Cys Gly
 1340 1345 1350

Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile Ser Gly Pro Arg
 1355 1360 1365

Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Ser Phe Thr Gly Pro Glu Cys
 1370 1375 1380

Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Val Gly Ser Asn Pro Cys Tyr
 1385 1390 1395

Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Asn Pro Phe Tyr Arg
 1400 1405 1410

Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu
 1415 1420 1425

Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro
 1430 1435 1440

Gln Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala
 1445 1450 1455

Gly	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Leu	Gln	Cys	Asn	Asn	His	Ala	Cys	Gly
1460						1465					1470			
Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu	Asn	Phe	Asn	Asp	Pro	Trp	Lys
1475						1480					1485			
Asn	Cys	Thr	Gln	Ser	Leu	Gln	Cys	Trp	Lys	Tyr	Phe	Ser	Asp	Gly
1490						1495					1500			
His	Cys	Asp	Ser	Gln	Cys	Asn	Ser	Ala	Gly	Cys	Leu	Phe	Asp	Gly
1505						1510					1515			
Phe	Asp	Cys	Gln	Leu	Thr	Glu	Gly	Gln	Cys	Asn	Pro	Leu	Tyr	Asp
1520						1525					1530			
Gln	Tyr	Cys	Lys	Asp	His	Phe	Ser	Asp	Gly	His	Cys	Asp	Gln	Gly
1535						1540					1545			
Cys	Asn	Ser	Ala	Glu	Cys	Glu	Trp	Asp	Gly	Leu	Asp	Cys	Ala	Glu
1550						1555					1560			
His	Val	Pro	Glu	Arg	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val
1565						1570					1575			
Leu	Leu	Pro	Pro	Asp	Gln	Leu	Arg	Asn	Asn	Ser	Phe	His	Phe	Leu
1580						1585					1590			
Arg	Glu	Leu	Ser	His	Val	Leu	His	Thr	Asn	Val	Val	Phe	Lys	Arg
1595						1600					1605			
Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Gln	Met	Ile	Phe	Pro	Tyr	Tyr	Gly	His	Glu
1610						1615					1620			
Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	His	Pro	Ile	Lys	Arg	Ser	Thr	Val	Gly	Trp
1625						1630					1635			
Ala	Thr	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Gln	Arg
1640						1645					1650			
Arg	Glu	Leu	Asp	Pro	Met	Asp	Ile	Arg	Gly	Ser	Ile	Val	Tyr	Leu
1655						1660					1665			
Glu	Ile	Asp	Asn	Arg	Gln	Cys	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Gln	Cys	Phe
1670						1675					1680			
Gln	Ser	Ala	Thr	Asp	Val	Ala	Ala	Phe	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Ser

ES 2 580 229 T3

1685						1690						1695		
Leu	Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ile	Glu	Ala	Val	Lys	Ser
1700						1705					1710			
Glu	Pro	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	His	Leu	Met	Tyr
1715						1720					1725			
Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Cys	Gly
1730						1735					1740			
Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg	Arg	Gln	His	Gly	Gln	Leu	Trp
1745						1750					1755			
Phe	Pro	Glu	Gly	Phe	Lys	Val	Ser	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Lys	Arg
1760						1765					1770			
Arg	Glu	Pro	Leu	Gly	Glu	Asp	Ser	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Lys
1775						1780					1785			
Asn	Ala	Ser	Asp	Gly	Ala	Leu	Met	Asp	Asp	Asn	Gln	Asn	Glu	Trp
1790						1795					1800			
Gly	Asp	Glu	Asp	Leu	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe	Arg	Phe	Glu	Glu	Pro
1805						1810					1815			
Val	Val	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Asp	Gln	Thr	Asp	His	Arg	Gln	Trp
1820						1825					1830			
Thr	Gln	Gln	His	Leu	Asp	Ala	Ala	Asp	Leu	Arg	Met	Ser	Ala	Met
1835						1840					1845			
Ala	Pro	Thr	Pro	Pro	Gln	Gly	Glu	Val	Asp	Ala	Asp	Cys	Met	Asp
1850						1855					1860			
Val	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	Phe	Thr	Pro	Leu	Met	Ile	Ala
1865						1870					1875			
Ser	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Glu
1880						1885					1890			
Glu	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Ile	Ser	Asp	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ala
1895						1900					1905			
Ser	Leu	His	Asn	Gln	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Glu	Thr	Ala	Leu	His
1910						1915					1920			

ES 2 580 229 T3

Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu
 1925 1930 1935
 Glu Ala Ser Ala Asp Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr
 1940 1945 1950
 Pro Leu His Ala Ala Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln
 1955 1960 1965
 Ile Leu Leu Arg Asn Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His
 1970 1975 1980
 Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu
 1985 1990 1995
 Gly Met Leu Glu Asp Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala
 2000 2005 2010
 Val Asp Asp Leu Gly Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val
 2015 2020 2025
 Asn Asn Val Asp Ala Ala Val Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn
 2030 2035 2040
 Lys Asp Met Gln Asn Asn Lys Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala
 2045 2050 2055
 Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu Thr Ala Lys Val Leu Leu Asp His
 2060 2065 2070
 Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His Met Asp Arg Leu Pro Arg
 2075 2080 2085
 Asp Ile Ala Gln Glu Arg Met His His Asp Ile Val Arg Leu Leu
 2090 2095 2100
 Asp Glu Tyr Asn Leu Val Arg Ser Pro Gln Leu His Gly Thr Ala
 2105 2110 2115
 Leu Gly Gly Thr Pro Thr Leu Ser Pro Thr Leu Cys Ser Pro Asn
 2120 2125 2130
 Gly Tyr Leu Gly Asn Leu Lys Ser Ala Thr Gln Gly Lys Lys Ala
 2135 2140 2145
 Arg Lys Pro Ser Thr Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser Lys Glu Ala
 2150 2155 2160

ES 2 580 229 T3

Lys Asp Leu Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ser Gln Asp Gly Lys Gly
 2165 2170 2175
 Cys Leu Leu Asp Ser Ser Ser Met Leu Ser Pro Val Asp Ser Leu
 2180 2185 2190
 Glu Ser Pro His Gly Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser Pro Pro Leu
 2195 2200 2205
 Leu Pro Ser Pro Phe Gln Gln Ser Pro Ser Met Pro Leu Ser His
 2210 2215 2220
 Leu Pro Gly Met Pro Asp Thr His Leu Gly Ile Ser His Leu Asn
 2225 2230 2235
 Val Ala Ala Lys Pro Glu Met Ala Ala Leu Ala Gly Gly Ser Arg
 2240 2245 2250
 Leu Ala Phe Glu Pro Pro Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val
 2255 2260 2265
 Ala Ser Ser Ala Ser Thr Val Leu Ser Thr Asn Gly Thr Gly Ala
 2270 2275 2280
 Met Asn Phe Thr Val Gly Ala Pro Ala Ser Leu Asn Gly Gln Cys
 2285 2290 2295
 Glu Trp Leu Pro Arg Leu Gln Asn Gly Met Val Pro Ser Gln Tyr
 2300 2305 2310
 Asn Pro Leu Arg Pro Gly Val Thr Pro Gly Thr Leu Ser Thr Gln
 2315 2320 2325
 Ala Ala Gly Leu Gln His Ser Met Met Gly Pro Leu His Ser Ser
 2330 2335 2340
 Leu Ser Thr Asn Thr Leu Ser Pro Ile Ile Tyr Gln Gly Leu Pro
 2345 2350 2355
 Asn Thr Arg Leu Ala Thr Gln Pro His Leu Val Gln Thr Gln Gln
 2360 2365 2370
 Val Gln Pro Gln Asn Leu Gln Leu Gln Pro Gln Asn Leu Gln Pro
 2375 2380 2385
 Pro Ser Gln Pro His Leu Ser Val Ser Ser Ala Ala Asn Gly His
 2390 2395 2400

ES 2 580 229 T3

Leu Gly Arg Ser Phe Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val
 2405 2410 2415

Gln Pro Leu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Val His Thr Ile Leu Pro
 2420 2425 2430

Gln Glu Ser Gln Ala Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Met Val
 2435 2440 2445

Pro Pro Met Thr Thr Thr Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His
 2450 2455 2460

Ser Tyr Ser Ser Ser Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu
 2465 2470 2475

Gln Val Pro Glu His Pro Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro
 2480 2485 2490

Asp Gln Trp Ser Ser Ser Ser Pro His Ser Asn Ile Ser Asp Trp
 2495 2500 2505

Ser Glu Gly Ile Ser Ser Pro Pro Thr Thr Met Pro Ser Gln Ile
 2510 2515 2520

Thr His Ile Pro Glu Ala Phe Lys
 2525 2530

<210> 3
 <211> 2321
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

5

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
 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

10

ES 2 580 229 T3

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

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

ES 2 580 229 T3

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

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

ES 2 580 229 T3

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
 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

ES 2 580 229 T3

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			
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
1520						1525					1530			
Arg	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser	Leu	Arg	Phe	Arg	Leu	Asp
1535						1540					1545			

ES 2 580 229 T3

Ala	His	Gly	Gln	Ala	Met	Val	Phe	Pro	Tyr	His	Arg	Pro	Ser	Pro
	1550					1555					1560			
Gly	Ser	Glu	Pro	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ile
	1565					1570					1575			
Gly	Ser	Val	Val	Met	Leu	Glu	Ile	Asp	Asn	Arg	Leu	Cys	Leu	Gln
	1580					1585					1590			
Ser	Pro	Glu	Asn	Asp	His	Cys	Phe	Pro	Asp	Ala	Gln	Ser	Ala	Ala
	1595					1600					1605			
Asp	Tyr	Leu	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Asp	Phe	Pro
	1610					1615					1620			
Tyr	Pro	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	Pro	Pro	Glu
	1625					1630					1635			
Pro	Ser	Val	Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Val	Leu
	1640					1645					1650			
Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Leu	Gly	Val	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Lys
	1655					1660					1665			
Arg	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Trp	Phe	Pro	Glu	Gly	Phe	Ser	Leu	His
	1670					1675					1680			
Lys	Asp	Val	Ala	Ser	Gly	His	Lys	Gly	Arg	Arg	Glu	Pro	Val	Gly
	1685					1690					1695			
Gln	Asp	Ala	Leu	Gly	Met	Lys	Asn	Met	Ala	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu
	1700					1705					1710			
Met	Gly	Glu	Val	Ala	Thr	Asp	Trp	Met	Asp	Thr	Glu	Cys	Pro	Glu
	1715					1720					1725			
Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Val	Glu	Glu	Pro	Gly	Met	Gly	Ala	Glu	Glu
	1730					1735					1740			
Ala	Val	Asp	Cys	Arg	Gln	Trp	Thr	Gln	His	His	Leu	Val	Ala	Ala
	1745					1750					1755			
Asp	Ile	Arg	Val	Ala	Pro	Ala	Met	Ala	Leu	Thr	Pro	Pro	Gln	Gly
	1760					1765					1770			
Asp	Ala	Asp	Ala	Asp	Gly	Met	Asp	Val	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Asp
	1775					1780					1785			

ES 2 580 229 T3

Gly Phe Thr Pro Leu Met Leu Ala Ser Phe Cys Gly Gly Ala Leu
 1790 1795 1800

Glu Pro Met Pro Thr Glu Glu Asp Glu Ala Asp Asp Thr Ser Ala
 1805 1810 1815

Ser Ile Ile Ser Asp Leu Ile Cys Gln Gly Ala Gln Leu Gly Ala
 1820 1825 1830

Arg Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala Leu His Leu Ala Ala Arg
 1835 1840 1845

Tyr Ala Arg Ala Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu Asp Ala Gly Ala
 1850 1855 1860

Asp Thr Asn Ala Gln Asp His Ser Gly Arg Thr Pro Leu His Thr
 1865 1870 1875

Ala Val Thr Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln Ile Leu Ile Arg
 1880 1885 1890

Asn Arg Ser Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met Ala Asp Gly Ser Thr
 1895 1900 1905

Ala Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Val Glu
 1910 1915 1920

Glu Leu Ile Ala Ser His Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Glu Leu
 1925 1930 1935

Gly Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Glu
 1940 1945 1950

Ala Thr Leu Ala Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn Lys Asp Met Gln
 1955 1960 1965

Asp Ser Lys Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly
 1970 1975 1980

Ser Tyr Glu Ala Ala Lys Leu Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg
 1985 1990 1995

Glu Ile Thr Asp His Leu Asp Arg Leu Pro Arg Asp Val Ala Gln
 2000 2005 2010

Glu Arg Leu His Gln Asp Ile Val Arg Leu Leu Asp Gln Pro Ser
 2015 2020 2025

ES 2 580 229 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	Val
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

ES 2 580 229 T3

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Leu Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

5 <210> 6
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE MAB 256 A-4
 <400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110

Thr Val

15 <210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE MAB 256 A-8
 <400> 7

ES 2 580 229 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Tyr	Ile	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Thr	Asp	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	His
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Pro	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala						
		115					120								

<210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE MAB 256 A-8

10

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110

Thr Val

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR-H1 DE MAB 256A-4

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Tyr Met Ser
 1 5 10

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR-H2 DE MAB 256A-4

<400> 10

Ile Ser Asn Gly Gly Gly Arg Thr Asp Tyr Pro Asp
 1 5 10

<210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 580 229 T3

<220>
<223> CDR-H3 DE MAB 256A-4

<400> 11

5

Arg Leu Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> CDR-L1 DE MAB 256A-4

15

<400> 12

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> CDR-L2 DE MAB 256A-4

25

<400> 13

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> CDR-L3 DE MAB 256A-4

35

<400> 14

Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> CDR-H1 DE MAB 256A-8

45

<400> 15

Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 16
<211> 12
<212> PRT

55

ES 2 580 229 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H2 DE MAB 256A-8

5

<400> 16

Tyr Ile Asn Ser Gly Gly Gly Arg Thr Asp Tyr Pro
1 5 10

10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> CDR-H3 DE MAB 256A-8

<400> 17

Leu Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

20

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-L1 DE MAB 256A-8

30

<400> 18

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

35

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> CDR-L2 DE MAB 256A-8

<400> 19

Tyr Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

45

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> CDR-L3 DE MAB 256A-8

<400> 20

55

Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
 1 5

5
 <210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Sintética

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Asn Pro Ser Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15
 <210> 22
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Sintética

<400> 22

ES 2 580 229 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 23
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 23

5

10

ES 2 580 229 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Gly Ser Ala His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

5

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 25
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 25

5
 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Arg Ser Asn Gln Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

ES 2 580 229 T3

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Tyr Thr Thr Pro Ser
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

15 <210> 27
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 27

ES 2 580 229 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 29

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile His
 1 5 10

15 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética
 <400> 30

Ala Arg Ile Asn Pro Ser Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

25 Lys Gly

30 <210> 31
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 580 229 T3

<223> Sintética

<400> 31

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Gly Ser Ala His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

5

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

15

<400> 32

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Arg Ser Asn Gln Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

20

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Sintética

<400> 33

Ala Arg Ile Asn Pro Ala Asn Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

30

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Sintética

<400> 34

40

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr
1 5 10

45

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 580 229 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Sintética

<400> 40

10
Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Ala Thr
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo antagonista anti-Notch3 para su uso en el tratamiento de una leucemia de linfocitos T sensible al inhibidor de la gamma-secretasa que no responde a un anticuerpo antagonista anti-Notch1.
2. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la leucemia de linfocitos T es una leucemia linfoblástica.
- 10 3. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la leucemia de linfocitos T es leucemia linfoblástica aguda de linaje T (LLA-T).
4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo antagonista anti-Notch3 es un anticuerpo anti-región reguladora negativa (RRN) de Notch3.
- 15 5. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-RRN de Notch3 se une al dominio A de una repetición LIN12/Notch (LNR-A) y al dominio C del dominio de heterodimerización (HD-C) de la RRN de Notch-3.
- 20 6. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-RRN de Notch3 es una forma humanizada del anticuerpo 256A-4, comprendiendo el anticuerpo 256A-4 la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 6; o 256A-8, comprendiendo el anticuerpo 256A-8 la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8.
- 25 7. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-RRN de Notch3 comprende las CDR de región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 256A-4, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 y 14; o del anticuerpo 256A-8, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19 y 20.
- 30 8. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo antagonista anti-Notch3 es un anticuerpo anti-Notch3 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch3.
9. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo antagonista anti-Notch3 se administra en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista específico de Notch1.
- 35 10. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo anti-región reguladora negativa (RRN) de Notch1.
- 40 11. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el anticuerpo anti-RRN de Notch1 se une al dominio A de una repetición LIN12/Notch (LNR-A), al dominio B de una repetición LIN12/Notch (LNR-B) y al dominio C del dominio de heterodimerización (HD-C) de la RRN de Notch1.
- 45 12. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el anticuerpo anti-RRN de Notch1 se selecciona de:
- 50 el Anticuerpo A, que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y la cadena ligera de SEQ ID NO:22; el Anticuerpo A-1, que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO:23 y la cadena ligera de SEQ ID NO:24; el Anticuerpo A-2, que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO:25 y la cadena ligera de SEQ ID NO:26; y el Anticuerpo A-3, que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO:27 y la cadena ligera de SEQ ID NO:28.
- 55 13. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el anticuerpo anti-RRN de Notch1 comprende las CDR de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado de:
- el Anticuerpo A, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 34, 35, 36 y 37; el Anticuerpo A-1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 31, 34, 35, 36 y 38; el anticuerpo A-2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 32, 34, 35, 36 y 39; y el Anticuerpo A-3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 33, 34, 35, 36 y 40.
- 60 14. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el anticuerpo antagonista anti-Notch1 es un anticuerpo anti-Notch1 que se une a una o más repeticiones de tipo EGF de Notch1.

Ser humano	661	GYEACACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCEGYHDPTCLSEVNEC	
Ratón	661	GYEACACEPGYTGSMCNVNIIDECAGSPCHNGGTCEDGIAGFTCRCEGYHDPTCLSEVNEC	
		*****	*****
		EGF18	EGF19
Ser humano	721	NSNPCVHGACRDSLNGYKDCDCPWGSGTNCDDINNECESNPCVNGGTCCKDMTSGYVCTCR	
Ratón	721	NSNPCIHGACRDGLNGYKDCAPWGSGTNCDDINNECESNPCVNGGTCCKDMTSGYVCTCR	
		*****	*****
		EGF20	
Ser humano	781	EGFSGPNCQFTNINECASNPCLNQGTCTDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRN	
Ratón	781	EGFSGPNCQFTNINECASNPCLNQGTCTDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCATSPCKN	
		*****	*****
		EGF21	EGF22
Ser humano	841	GGECROSEDIYESFSCVCPGTGWOGQTCEVDINECVLSPCRHGASCONTHGGYRCHCOAGYS	
Ratón	841	SGVCKESEDYIESFSCVCPGTGWOGQTCEVDINECVKSPCRHGASCONTHGGYRCHCOAGYT	
		* * *****	* * *****
		EGF23	
Ser humano	901	GRNCETDIDDCRPNPCHNGGCTDGTAFCDCLPGFRGTFCCEEDINECASDPCRNGANC	
Ratón	901	GRNCESDIDDCRPNPCHNGGCTDGTAFCDCLPGFQGFCEEDINECASNPQNGANC	
		*****	*****
		EG24	EGF25
Ser humano	961	TDCVDSYTCTCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQH	
Ratón	961	TDCVDSYTCTCPVGFNGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQY	
		*****	*****
		EGF26	
Ser humano	1021	DVNECDSPCLHGGTCQDGCYSYRCTCPQGYTGPNQNLVHWCDSAPCKNGGKWCQHTHQ	
Ratón	1021	DVNECDSPCLHGGTCQDSYGTQYKCTCPQGYTGLNQNLRWCDSAPCKNGGRCWQHTNQ	
		*****	*****
		EGF27	EGF28
Ser humano	1081	YRCECPSGWTGLYCDVPSVSCVAAQRQGVVVARLCOHGGLCVDAGNTHHCRCQAGYTGS	
Ratón	1081	YHCECRSGWTGVNCDVLSVSCVAAQKRGIDVTLCOHGGLCVDGDKHYCHCQAGYTGS	
		* * *****	* * *****
		EGF29	
Ser humano	1141	YCEDLVDECSFSPQNGATCTDYLGGSCKCVAGYHGVNCSEEIDECLSHPCQNGGTCID	
Ratón	1141	YCEDEVDECSFNPQNGATCTDYLGGSCKCVAGYHGSNCSEEINECLSQPCQNGGTCID	
		*****	*****
		EGF30	EGF31
Ser humano	1201	LPNTYKCS CPRGTQGVHCEINVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFV	
Ratón	1201	LTNSYKCS CPRGTQGVHCEINVDDCHPPLDPASRSPKCFNNGTCVDQVGGYTCTCPPGFV	
		* * *****	* * *****
		EGF32	
Ser humano	1261	GERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVNDHFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKCKNGG	
Ratón	1261	GERCEGDVNECLSNPCDPRGTQNCVQRVNDHFHCECRAGHTGRRCESVINGCRGKPKCKNGG	
		*****	*****
		EGF33	EGF34

FIG. 1B

Ser humano	1321	TCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSP ¹ TCLCLGPF ² TG
Ratón	1321	VCAVASNTARGFICRC ¹ PAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSP ¹ TCLCLGS ² FTG

		EGF35
Ser humano	1381	PECQFFASSPCLGGNFCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGGAGRDI
Ratón	1381	PECQFFASSPCVGSNFCYNQGTCEPTSENPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFTGGAGRDI

		EGF36
Ser humano	1441	PPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF
Ratón	1441	PPPQIEEACELPECQVDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF

		LNR_A LNR_B
Ser humano	1501	SDGHCD ¹ SQCNSAGCLFDGFD ¹ CQRAEQ ¹ CNPLYDQYCKDHFSDGHCD ¹ QGCNSAECEWDGLD
Ratón	1501	SDGHCD ¹ SQCNSAGCLFDGFD ¹ CQLTEGQC ¹ NPLYDQYCKDHFSDGHCD ¹ QGCNSAECEWDGLD

		LNR_C
Ser humano	1561	CAEHVPERLAAGTLVVVVLMPEQLRNS ¹ SFHLREL ¹ SRVLE ¹ TNVVFKRDAHQ ¹ QOMIF ¹ FYY
Ratón	1561	CAEHVPERLAAGTLV ¹ LVLL ¹ PPD ¹ QLRNS ¹ SFHLREL ¹ SHVLE ¹ TNVVFKRDAQ ¹ QOMIF ¹ FYY

		HD-N
Ser humano	1621	GREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELD ¹ PMDV ¹ RGSI ¹ VYLEI
Ratón	1621	GHEEELRKHPIKRSTVGWAT-----SLLPGTS-GGRQRRELD ¹ PMDIR ¹ GSIVYLEI

		S1 HD-C
Ser humano	1681	DNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFM ¹ YVA
Ratón	1671	DNRQCVQSSSQCFQSATDVA AFLGALASLGSLNIPYKIEAVKSEVPEPLPSQLHLM ¹ YVA

		S2 TM
Ser humano	1741	AAAFVLLFFVGC ¹ GVLLSRKRRRQH ¹ GQLW ¹ FPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPL ¹ RNA
Ratón	1731	AAAFVLLFFVGC ¹ GVLLSRKRRRQH ¹ GQLW ¹ FPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPL ¹ KNA

Ser humano	1801	SDGALMDDNQNEWGDEDELETKKFRFE ¹ EPVVL ¹ PD ¹ LD ¹ Q ¹ T ¹ DHRQ ¹ WT ¹ QQH ¹ LD ¹ AADLRMSAM ¹ AP
Ratón	1791	SDGALMDDNQNEWGDEDELETKKFRFE ¹ EPVVL ¹ PD ¹ LS ¹ D ¹ Q ¹ T ¹ DHRQ ¹ WT ¹ QQH ¹ LD ¹ AADLRMSAM ¹ AP

Ser humano	1861	T ¹ PPQGEVDAD ¹ CM ¹ DV ¹ NVR ¹ GP ¹ DG ¹ F ¹ T ¹ PL ¹ MI ¹ ASC ¹ SGG ¹ LET ¹ CN ¹ SE ¹ EEEE ¹ D ¹ AP ¹ AV ¹ IS ¹ DF ¹ I ¹ YQ ¹ GA ¹ SL
Ratón	1851	T ¹ PPQGEVDAD ¹ CM ¹ DV ¹ NVR ¹ GP ¹ DG ¹ F ¹ T ¹ PL ¹ MI ¹ ASC ¹ SGG ¹ LET ¹ CN ¹ SE ¹ EEEE ¹ D ¹ AP ¹ AV ¹ IS ¹ DF ¹ I ¹ YQ ¹ GA ¹ SL

Ser humano	1921	HNQTDRTGETALH ¹ LAARYSRSDAAKRLLEASADANI ¹ QDNMGR ¹ TPL ¹ HAAVSADAQGV ¹ FQIL
Ratón	1911	HNQTDRTGETALH ¹ LAARYSRSDAAKRLLEASADANI ¹ QDNMGR ¹ TPL ¹ HAAVSADAQGV ¹ FQIL

FIG. 1C

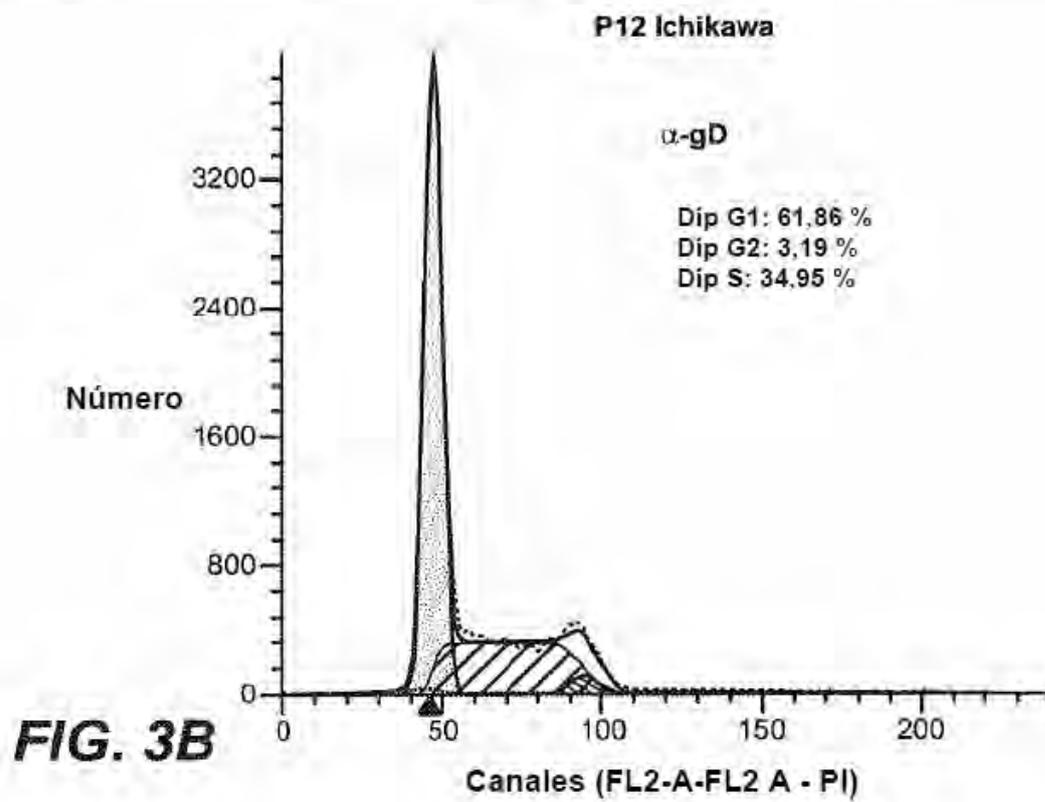
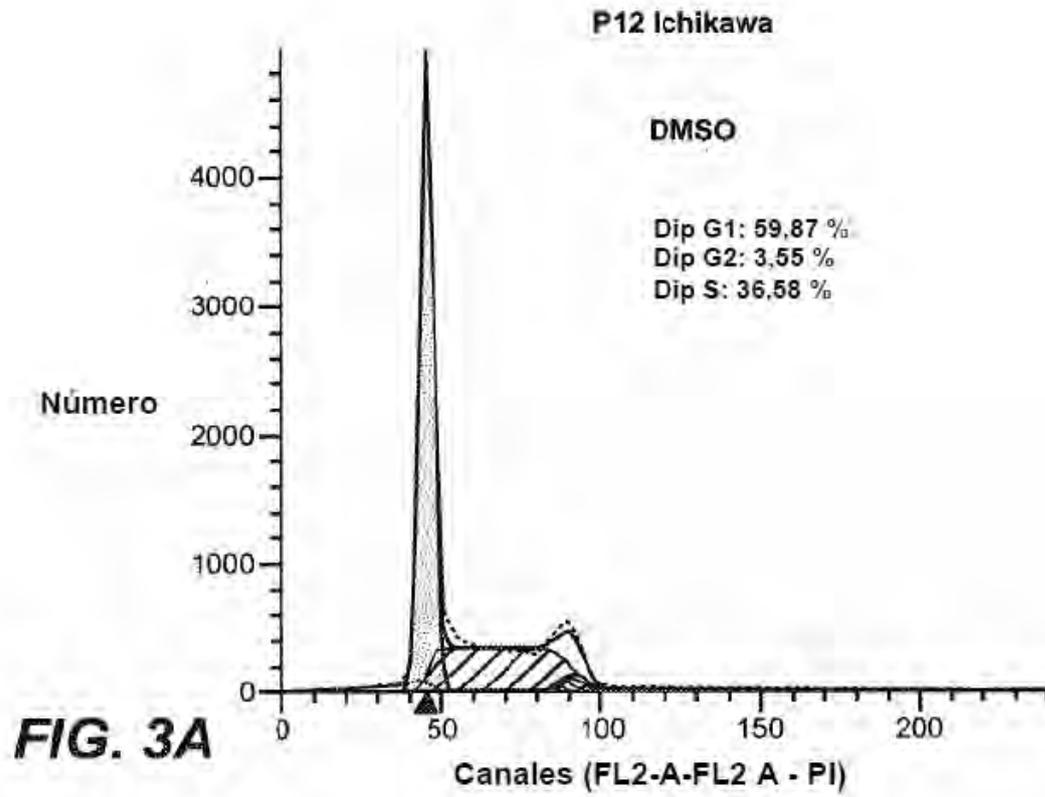
Ser humano	1981	IRNRATDLDMARMHDGTTPLILAAARLAVEGMLLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAAVNN
Ratón	1971	LRNRATDLDMARMHDGTTPLILAAARLAVEGMLLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAAVNN *****
Ser humano	2041	VDAAVVLLKMGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDLPRDI
Ratón	2031	VDAAVVLLKMGANKDMQNNKEETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDLPRDI *****
Ser humano	2101	AQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSCLKPGVQGKVRK
Ratón	2091	AQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGALGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKLSATQGKKARK *****
Ser humano	2161	PSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSGMLSPVDSLES PHGYLSDVASPPLL P
Ratón	2151	PSTKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSSMLSPVDSLES PHGYLSDVASPPLL P ** *****
Ser humano	2221	SPFQQSPSVPLNHLPGMPDTHLIGIHLNVAAKPEMAALGGGRLAFETGPPRLSHLPVAS
Ratón	2211	SPFQQSPSMPLSHLPGMPDTHLIGIHLNVAAKPEMAALAGCSRLAFEPPLSHLPVAS ***** ** *****
Ser humano	2281	GTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAP
Ratón	2271	SASTVLSTNGTGAMNFTVGAPASLNGQCEWLPRLQNGMVP SQYNPLRPGVTPGTLSTQAA **** ** ***** ** ***** ** ***** * ** *****
Ser humano	2341	SLQHGMVGPLHSSLAAGALSQMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQMQQQNLQPA
Ratón	2331	GLQHSMGPLHSSLSLSTNTLSPII-YQGLPNTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQLQPQNLQP- *** * ***** ** ***** ***** ***** * *****
Ser humano	2401	NIOQQQSLQPPPPPQPHLGVSAAASGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSSLAVHTILPQE
Ratón	2389	-----PSQPHLSVSSAANGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSSLPVHTILPQE * **** ***** ***** ***** ***** *****
Ser humano	2461	SPALPTSLPSSLVPPVTAQFLTPFSQHSYSS-PVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQ
Ratón	2436	SQALPTSLPSSMVPMTTQFLTPFSQHSYSSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQ * ***** ** * ***** ***** ***** ***** *****
Ser humano	2520	WSSSSPHSNVSDWSEGVSPPPTSMQSQIARIPEAFK
Ratón	2496	WSSSSPHSNISDWSEGISSPPTMPSQITHIPEAFK ***** ***** ***** * ** *****

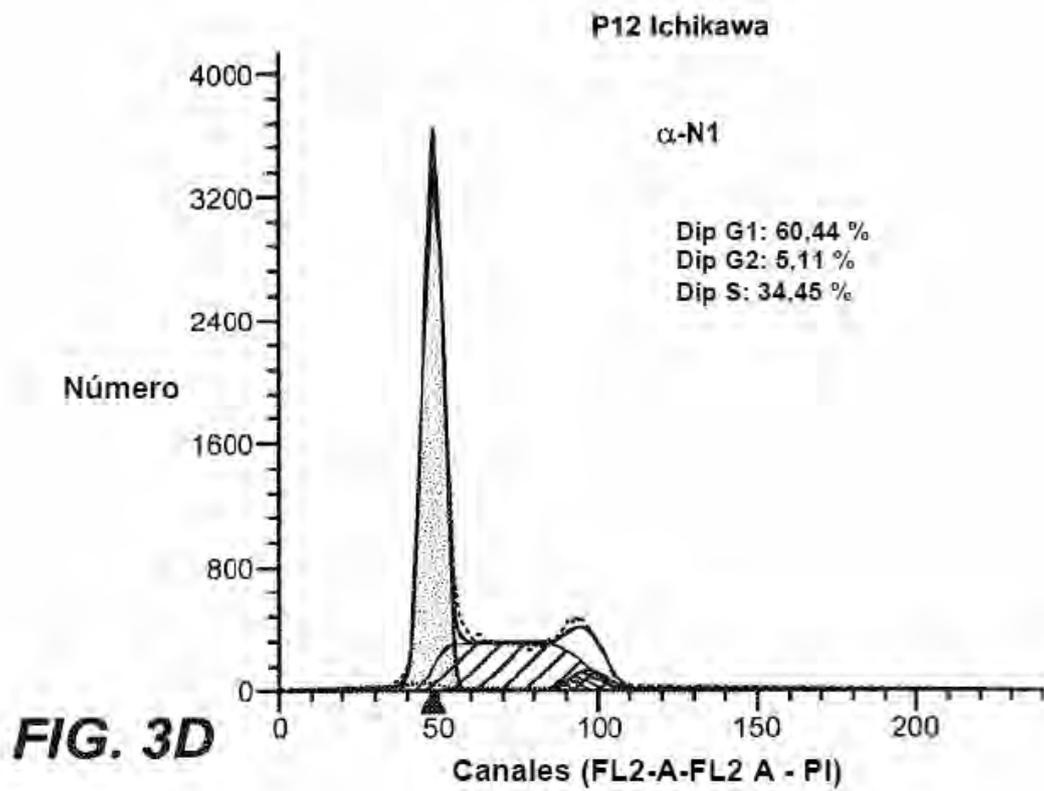
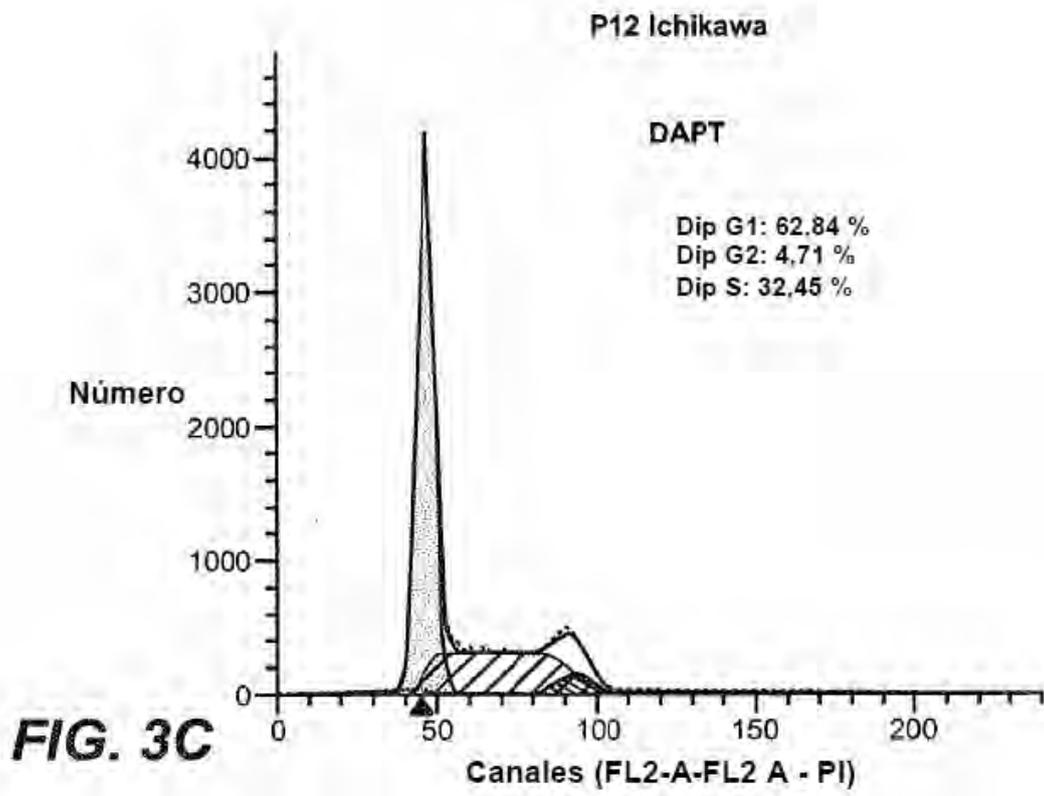
FIG. 1D

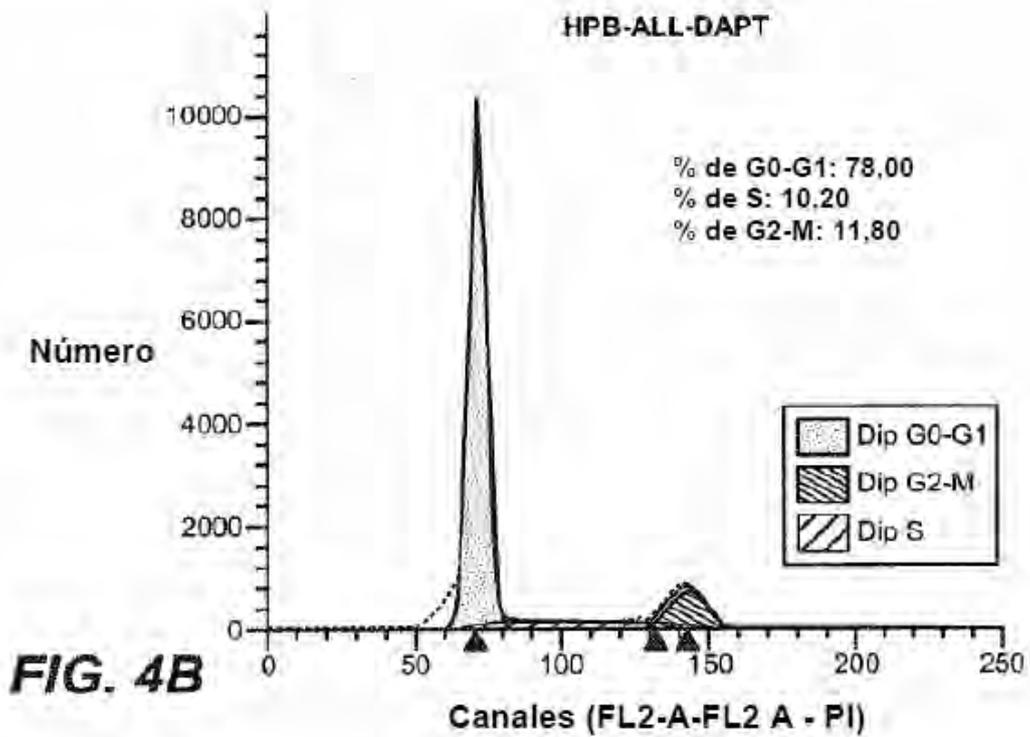
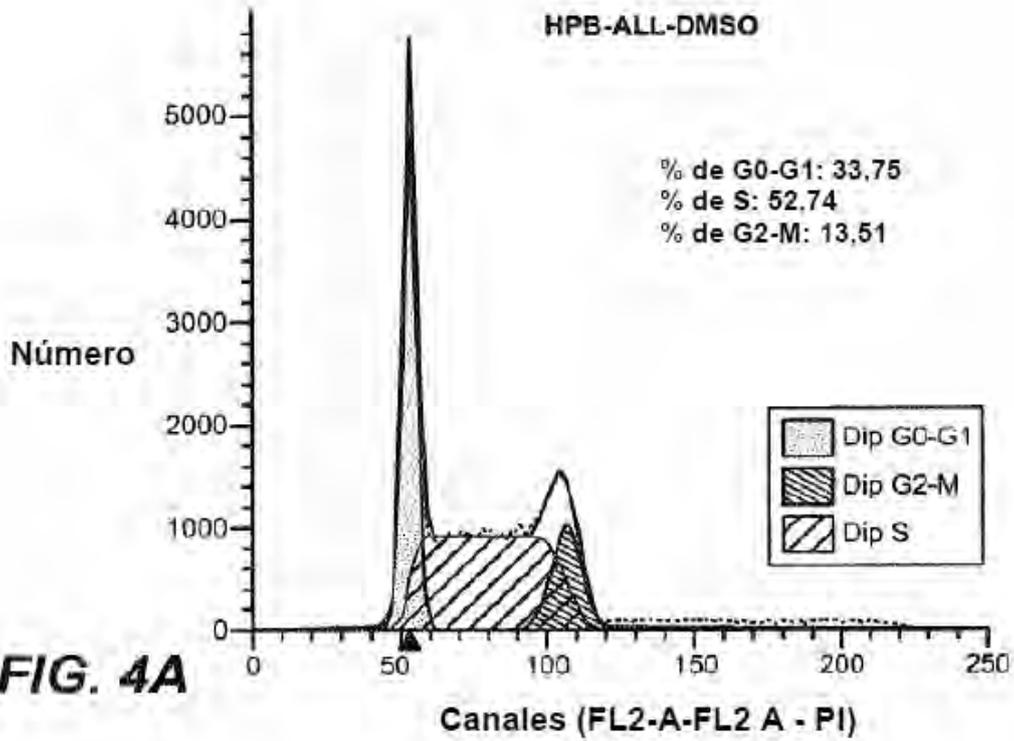
Secuencia de aminoácidos de Notch3 humana (NP_000426)

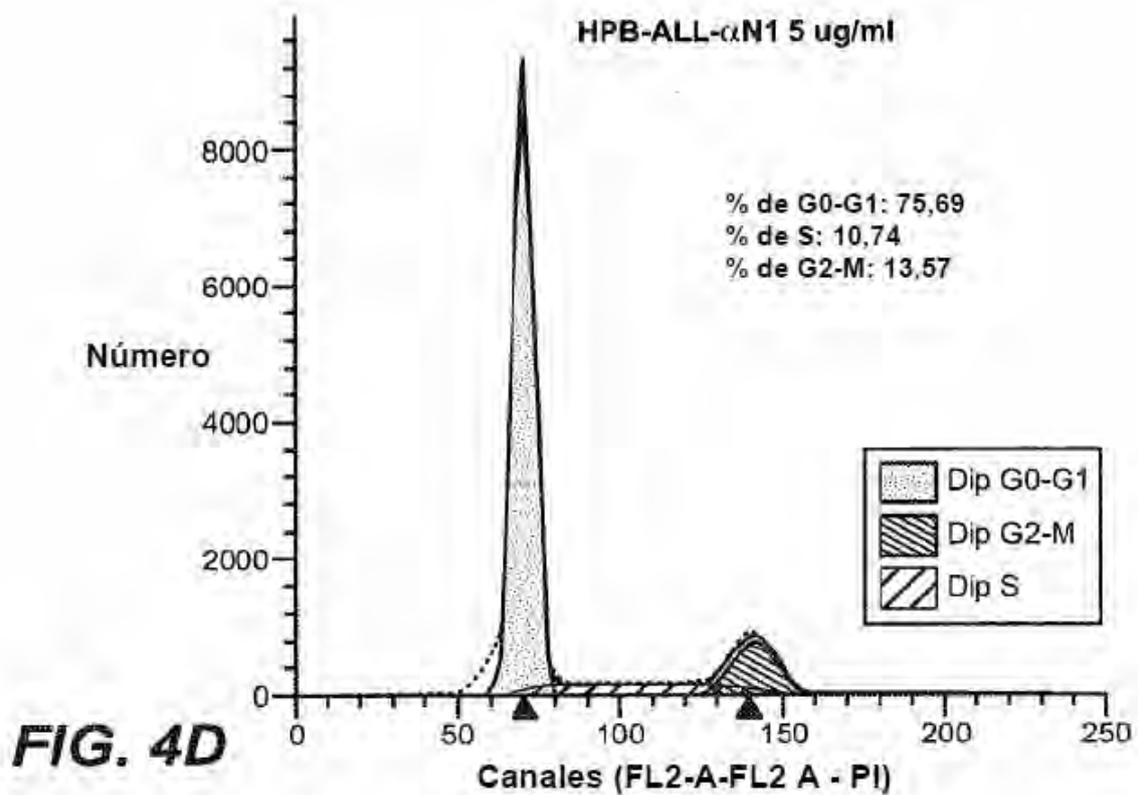
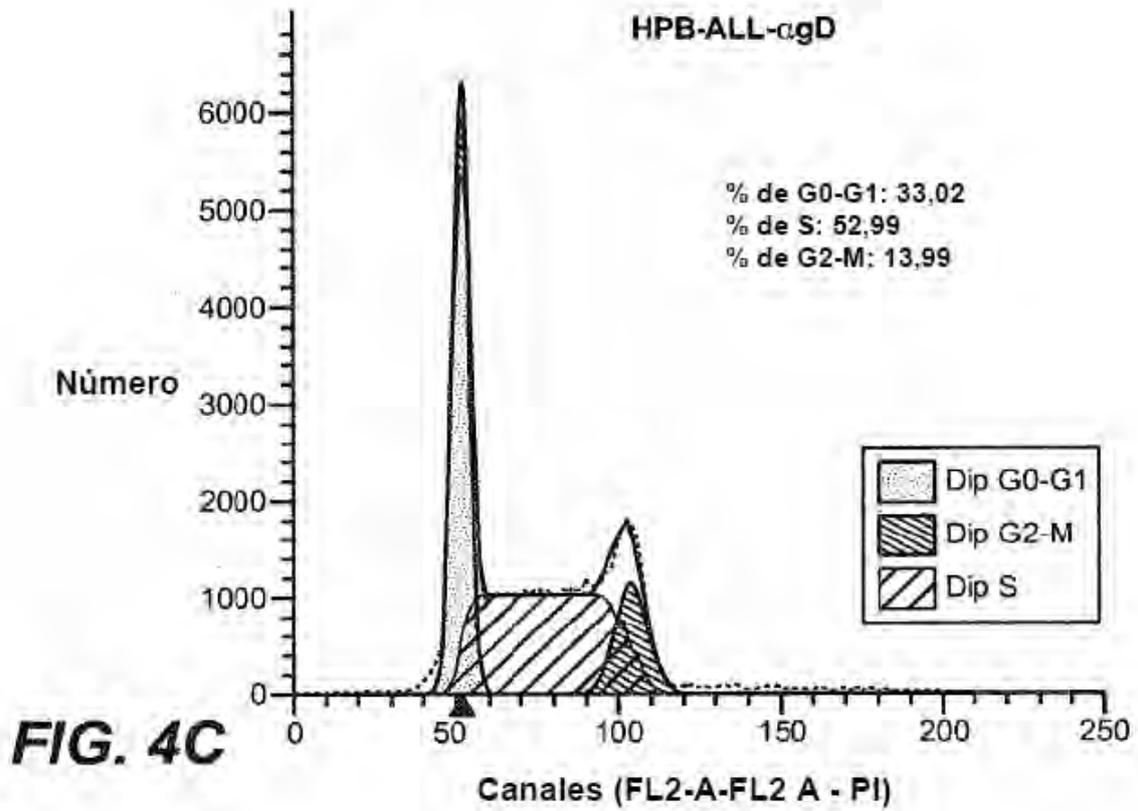
1 MGPGARGRRR RRRPMSPPPP PPPVRLPLL LLLAGPGAAA PPCLDGSPCA NGGRCTQLPS
 61 REAACLPPPG WVGRCQLRD PCHSGPCAGR GVCQSSVVAG TAREPSCRCPR GFRGPDGSLP
 121 DFCLSSPCA H GARCSVGPDG RFLCSPPGY QGRSCRSDVD ECFVGEPCRH GGTCLNTPGS
 181 FRCCCPAGYT GPLCENPAVP CAPSPORNNG TCROSGDLTY DCACLPGFEG QNCFVNVDDC
 241 PGHFCLNGGT CVDGVNTYNC QCPPEWTGQF CTEDVDECQL QPNACHNGGT CFNPLGGHSC
 301 VCVNGWTGES CSONIDDCAT AVCFHGATCH DRVASFYCAC PMCKTGLLCH LBDACVSNPC
 361 HEDAICDTNF VNGRAICTCP PGFTGGACDQ DVDECSIGAN PCEHLGRCVN TQGSFLCOGG
 421 RGYTGPRCET DVNECLSGPC RNOATCLDRI GQFTCLMAG FTGTYCEVDI DICQSSPCVN
 481 GGVCKDRVNG FSCTCESGFS GSTCQLDVDE CASTPCRNGA KCVDDQDGYE CRCAEGTEGT
 541 LCDFENVDCS PDFCHHGRCV DGIASFSCAC APGYTGTRCE SQVDECRSQF CRHGGKCLDL
 601 VDKYLRCRCP S TTGVNCEVN IDDCASNPT FVCRDGINR YDCVCQPGFT GLCNVEINE
 661 CASSPCGEGG SCVDGENGFR CLCPPGSLPP LCLPPSHPCA HEFCSHGICY DAPGGTRCVC
 721 EPGWSGPRCS QSIARDACES QPCRAGGTCS SDGMGFHTC PFCVOGRQCE LLSPTFPNPC
 781 EHGGRCESAP GQLPVCSCPQ GWQGRCCQD VDECAGPAPC GPHGICTNLA GSFCTCHGG
 841 YTGESCDDI NDCDFNPCLN GGSCQDGVGS FSCSCLPGFA GPRCARDVDE CLSNPCGPGT
 901 CTDHVASETC TOPPGYGGFH CEQDLPCDSP SSCFNGGTCV DGVNSFSLC REGYTGAIHQ
 961 HEADPCLSRP CLHGGVCSAA HPGFRCTCLE SFTGPOCOTL VDWCSDPCO NGGRCVOTGA
 1021 YCLCPPGWSG RLCDIRSLPC REAAQIGVR LEQLCQAGGQ CVDEDSHYC VCEGRTGSH
 1081 CEQEVDPCLA QPCQHGCTCR GYMGGYMCEC LFGYNGDNCE DDVDECASOP CQHGSSCIDL
 1141 VARYLCSCPP GTLGLVCEIN EDDCGPGPPL DSGFRCLHNG TCVDLVGGFR CTCPPSYTGL
 1201 RCEADINECR SGACHAANTR DCLQDPGGSE RCLCHAGFSG PRCQTVLSPC ESQPCQHGQ
 1261 CRPSPGPGGG LTFTCHCAQP FWGPRCERVA RSCRELQCPV GVECOQTPRG PFCACPPGLS
 1321 GPSCRSFPGS PFGASNASCA AAPCLHGGSC RPAFLAPFFR CACAQGTGP RCEAPAAAPE
 1381 **VSEPRCPRA ACQAKRGDQR CDRECNTPGC GWDGGDCSL S VGDPWRQCEA LQCWRLFNNS**
 1441 **RDFACSSPA CLYDNFDCHA GGRETCNPV YEKYCADHFA DGRCDQGCNT EECGWDGLDC**
 1501 **ASEVPAILAR GVIVLTVLLP PEELLRSSAD FLQRLSAILR TSLRPRLDAM GQAMVFPYHR**
 1561 PSPGSEPRAR RELAPEVIGS VVMLEIDNRL CLQSPENDIC FPDAQSAADY LGALSAVERL
 1621 DFPYPLRDVR GEPLEPPEPS VPLLPLLVAG AVLLLVIHLV GVMVARRKRE HSTLWFPEGF
 1681 SLHKDVASGH KGRREPVGQD ALGMKNMAKG ESLMGEVATD WMDTECPKAK RLKVEEPGMS
 1741 AEEAVDCRQW TQHHLVAADI RVAPAMALTF PQGDADADGM DVNVRGPDGF TPLMLASFCG
 1801 GALEPMPTEE DEADTSASI ISDLICQGAQ LGARTDRTGE TALHLAARYA RADAARKLLD
 1861 AGADTNAQDH SGRTPHHTAV TADAQGVFQI LTRNRSTDLD ARMADGSTAL ILAARLAVEG
 1921 MVEELIASHA DVNAVDELGK SALHWAAAVN NVEATLALLK NGANKDMQDS KRETPLFLAA
 1981 REGSYEAAKL LLDHFANREI TDHLDRLPQD VAQERLHQDI VRLLDQPSGF RSPPGPHGLG
 2041 PLLCPPGAPL PGLKAAQSGS KKSRRPPGKA GLGPQGRGR GKLLTLACPG PLADSSVLS
 2101 PVDSLDSRP FCGPPASPGG FPLEGPYAAA TATAVSLAQL GGFGRAGLGR QPPGGCVLSL
 2161 QLLNPVAVPL DWARLPPPAP PGPSFLPLA PGPQLLNPST PVSPQERPPP YLAVRPHGEE
 2221 YFVAGAHSSP PKARFLRVPS EHPYLTSPSE SPEHWASPS PSLSDWSEST PSPATATGAM
 2281 ATTTGALFAQ PLFLSVFSSL AQAQTQLGQ FEVTPKRQVL A (SEQ ID NO 3)

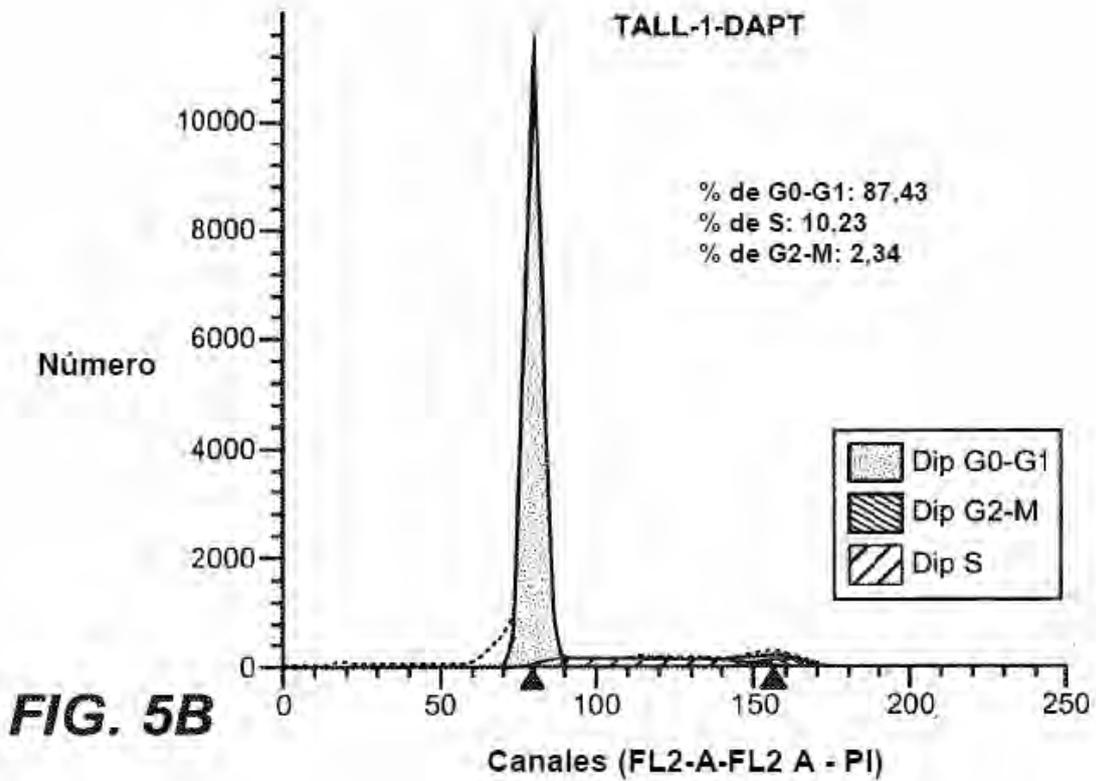
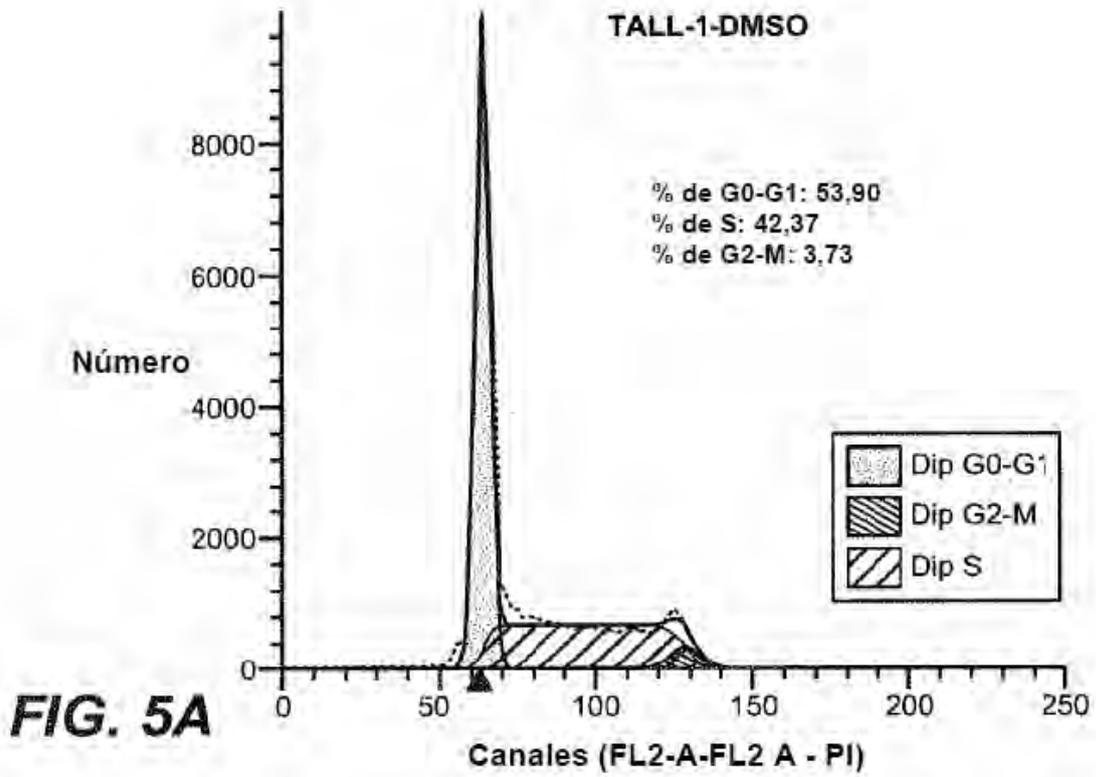
FIG. 2

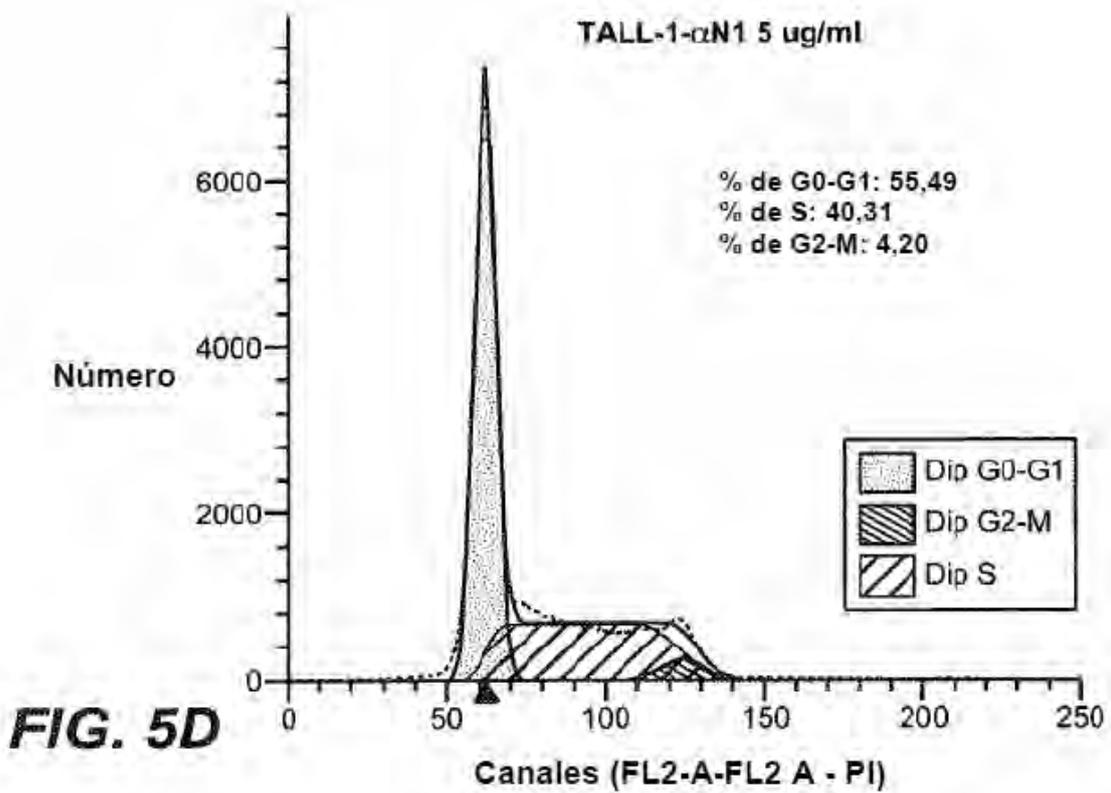
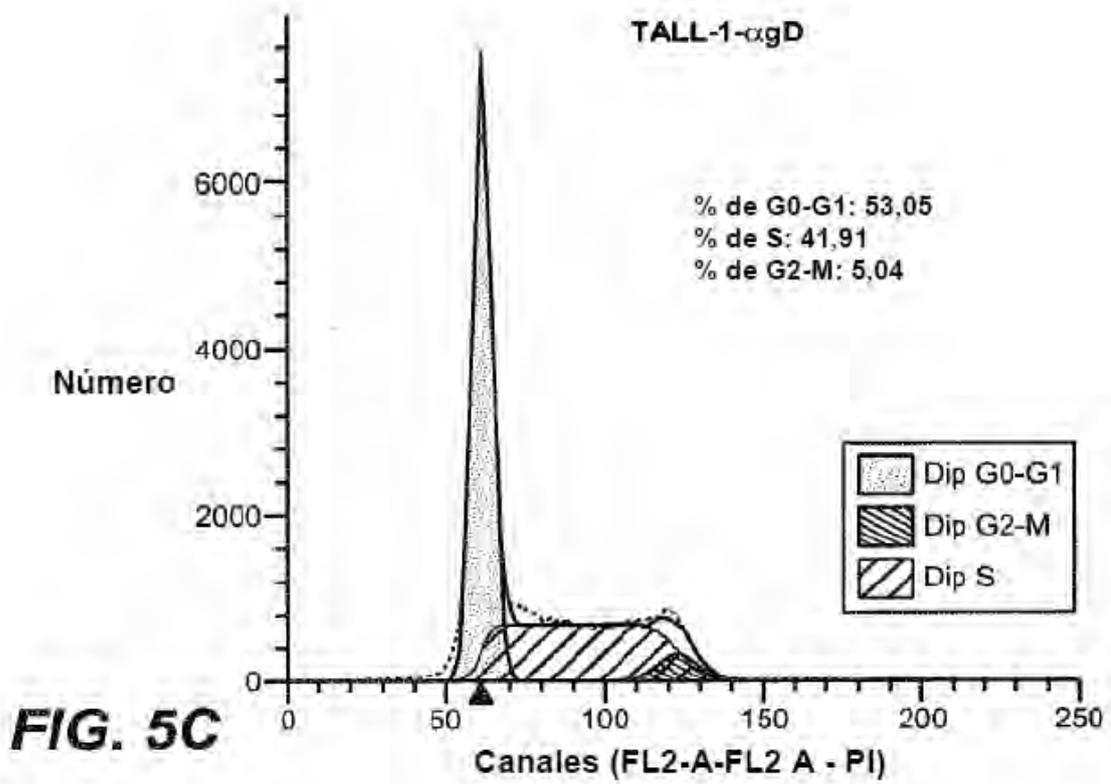












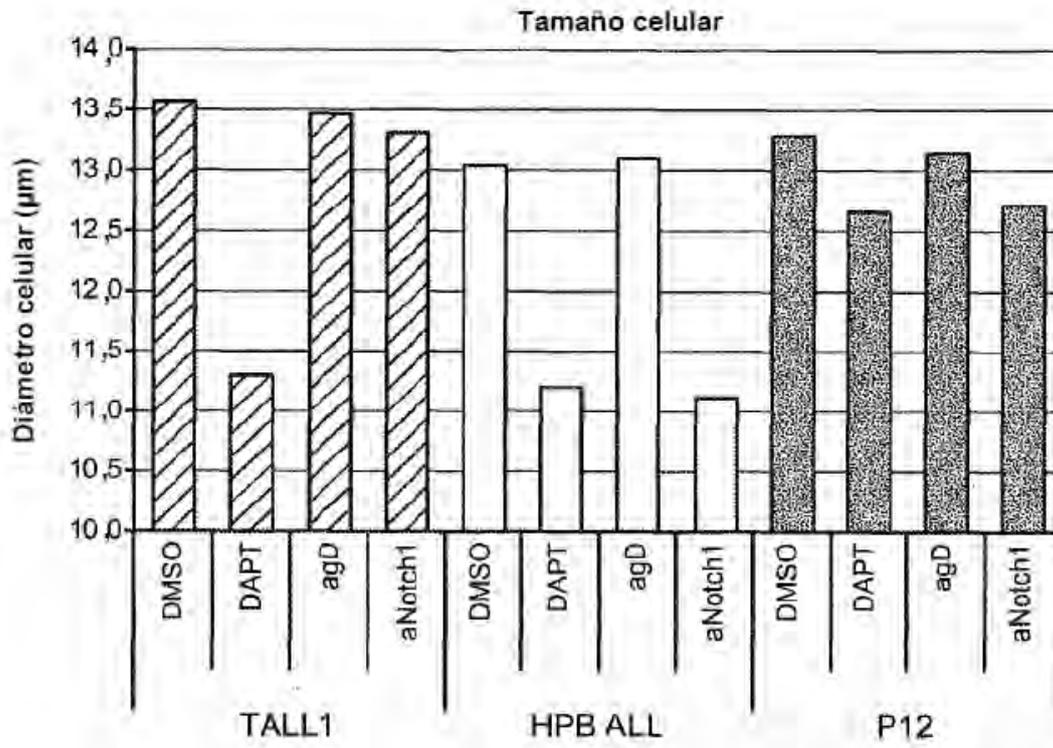


FIG. 6

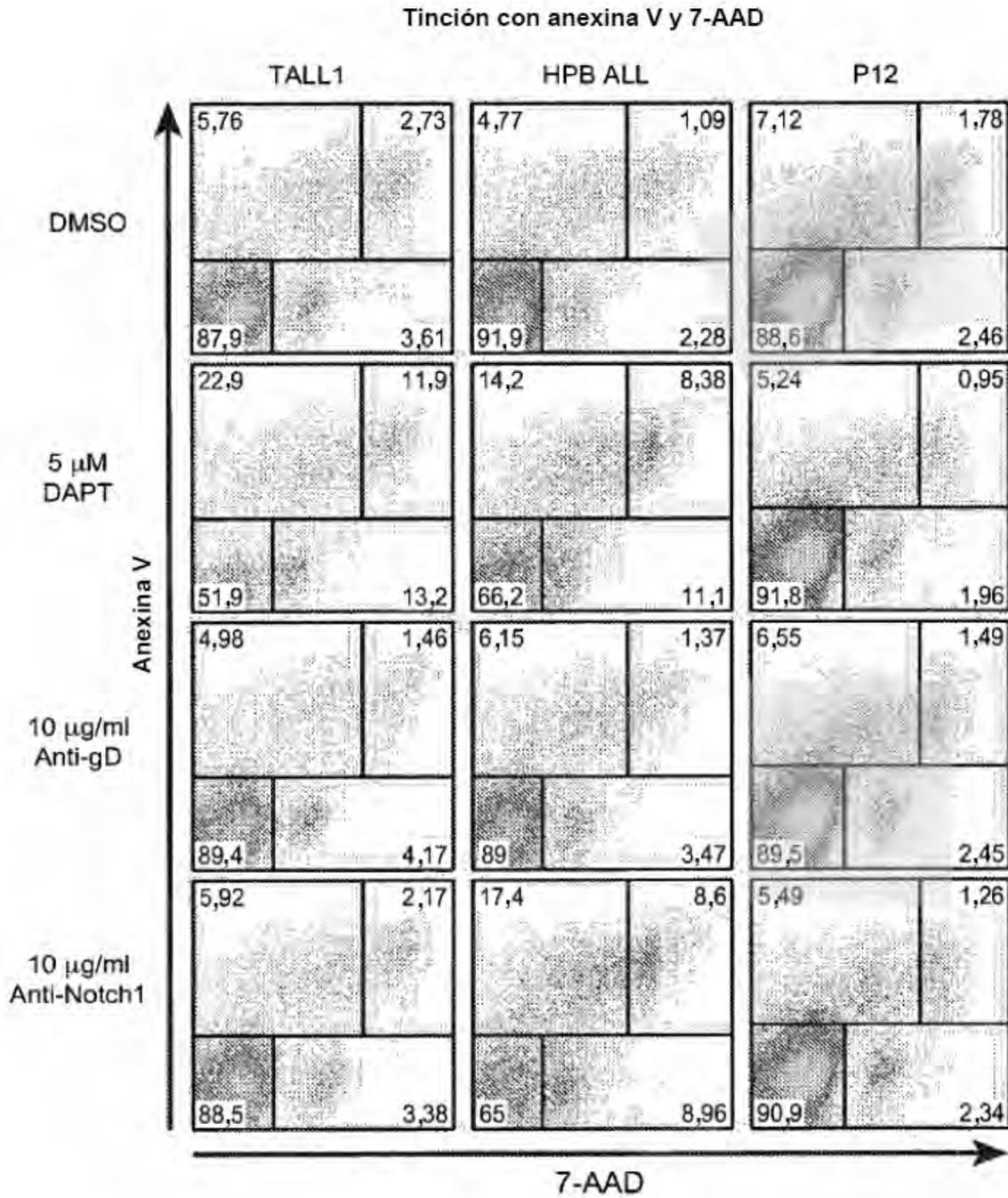


FIG. 7

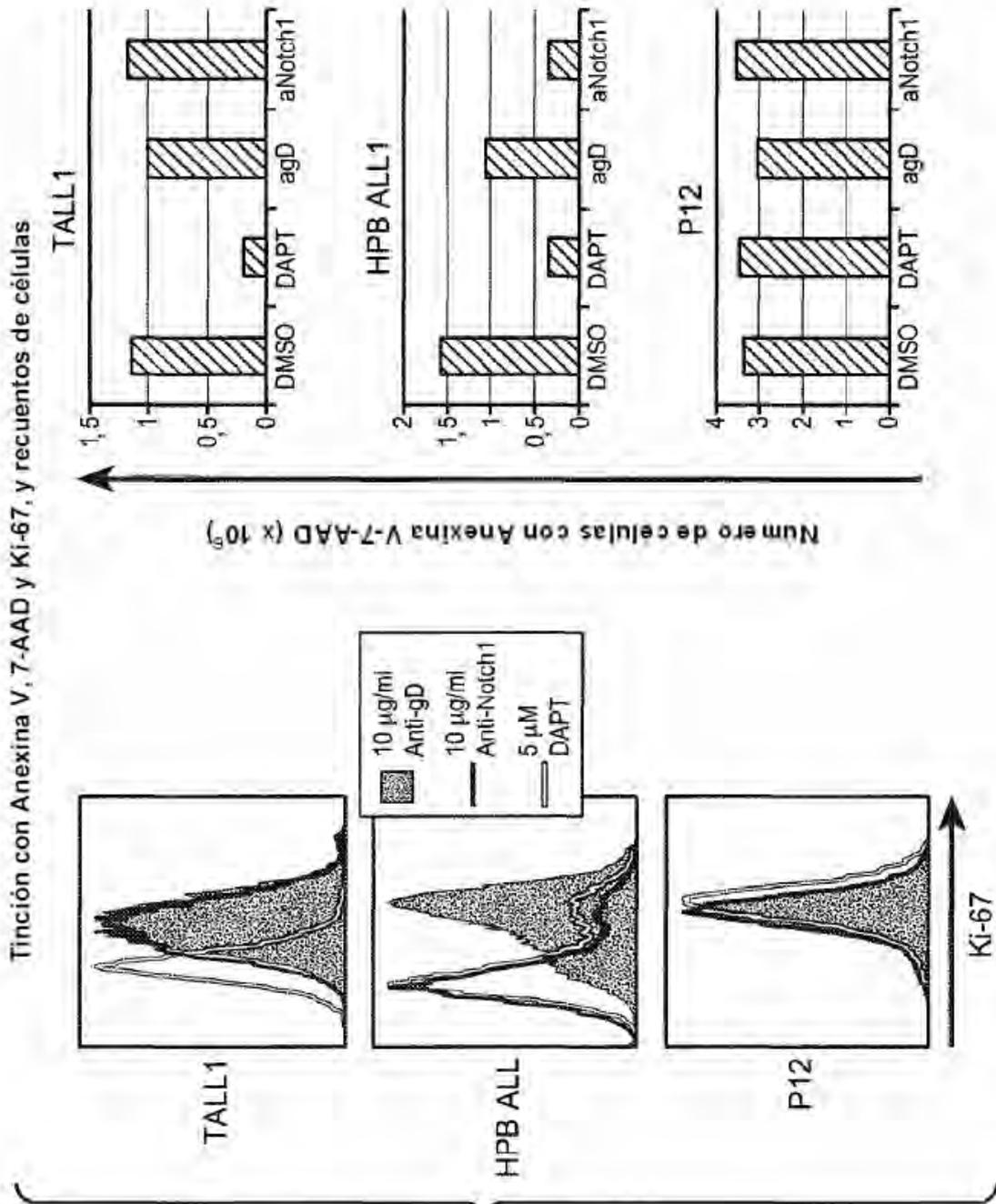
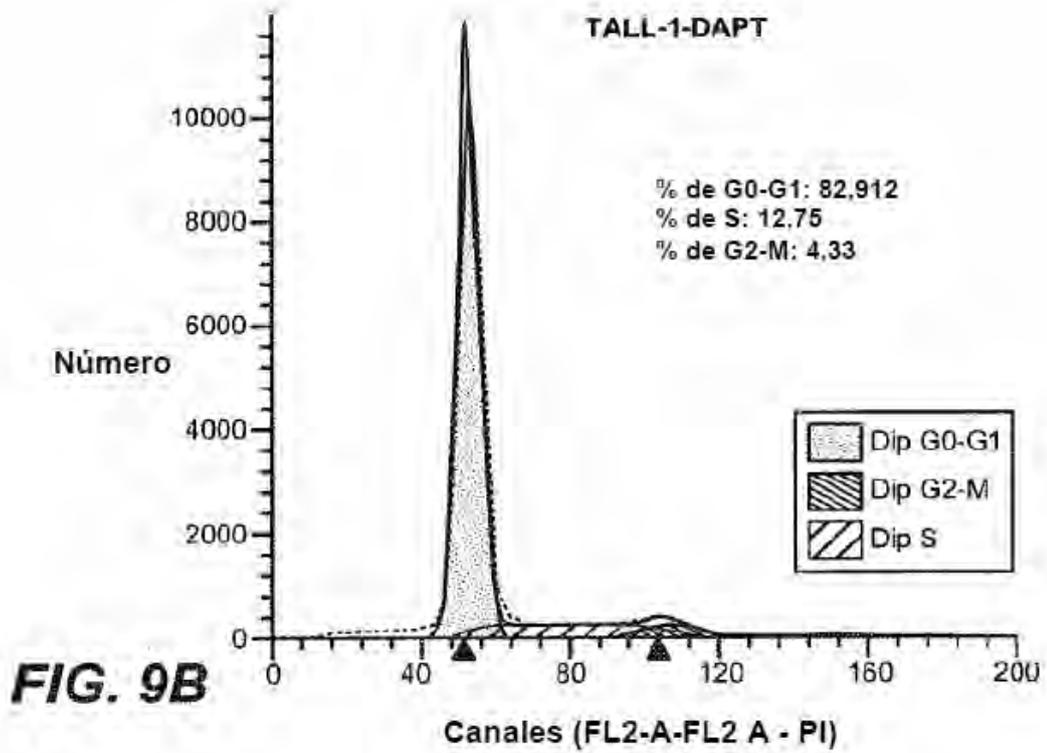
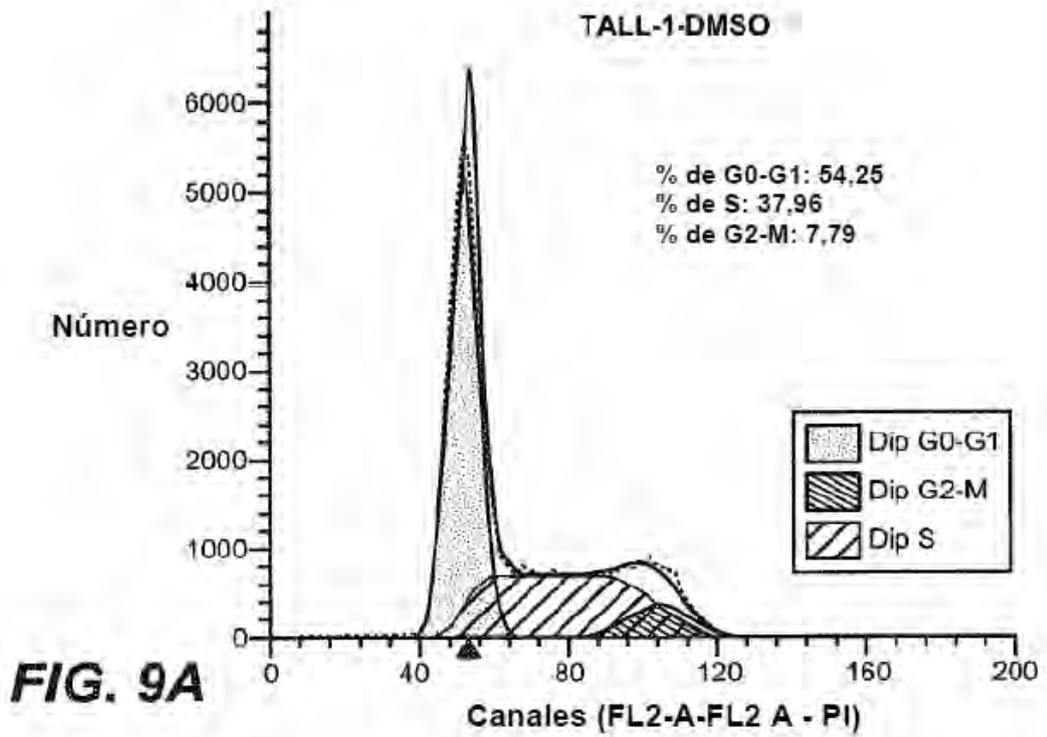
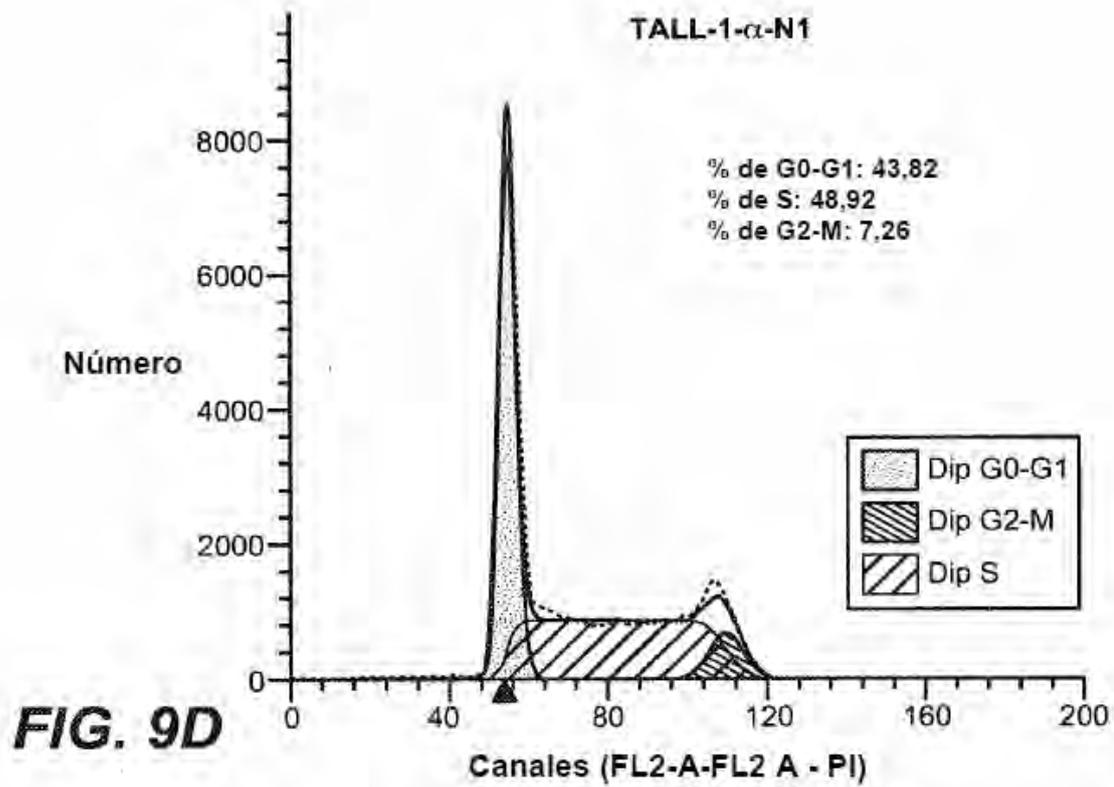
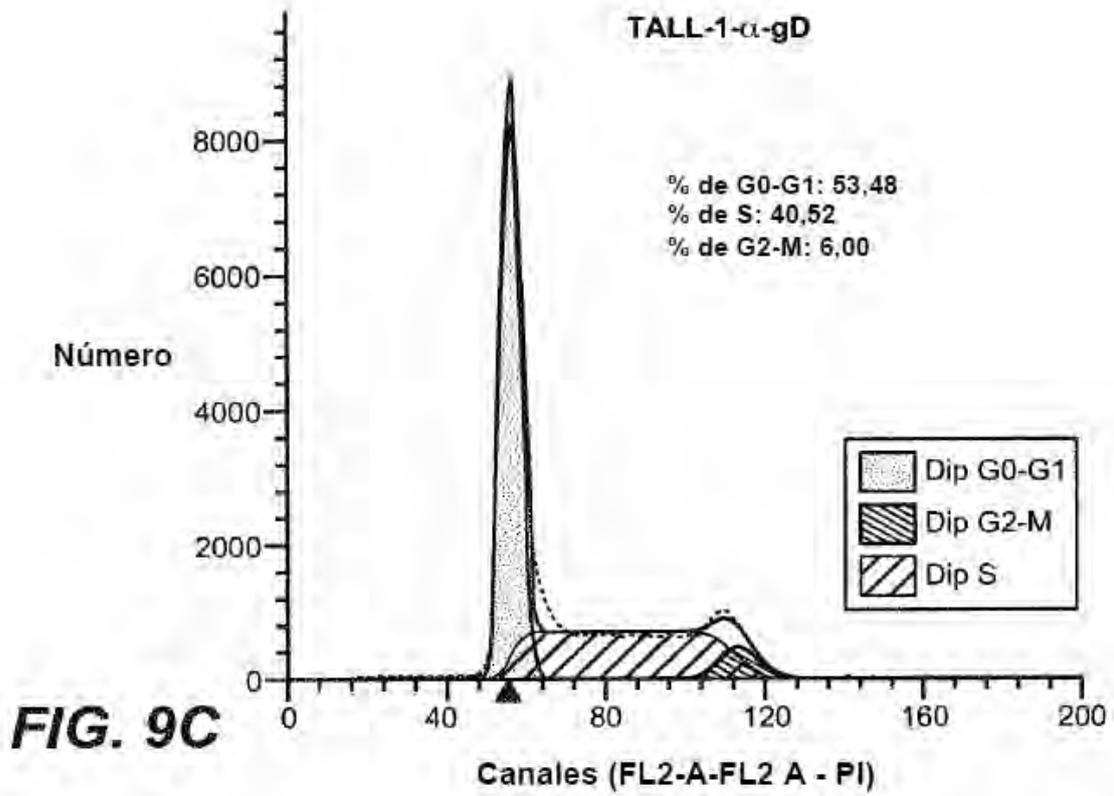
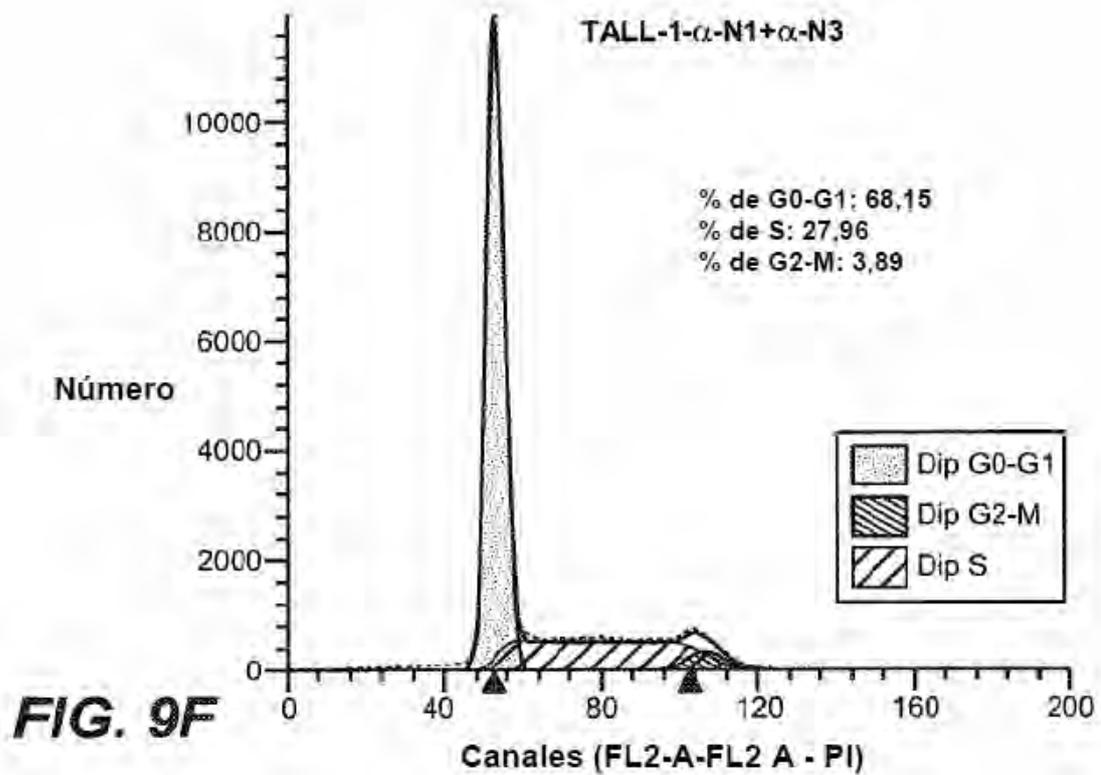
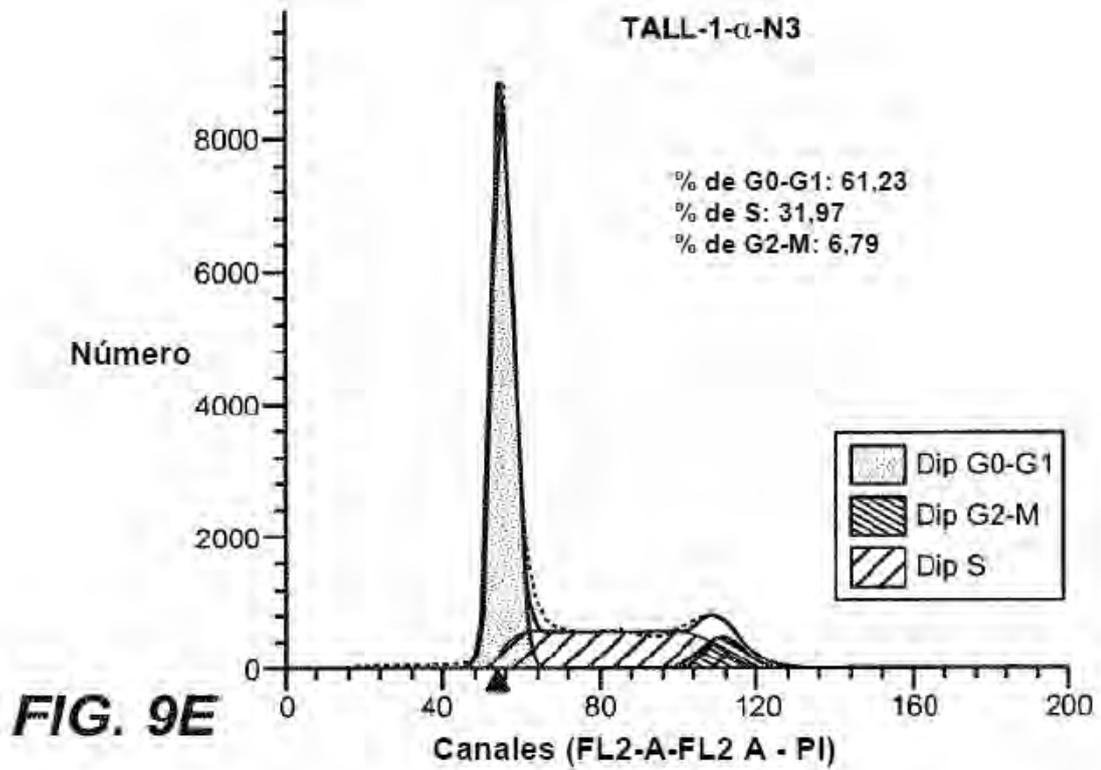


FIG. 8







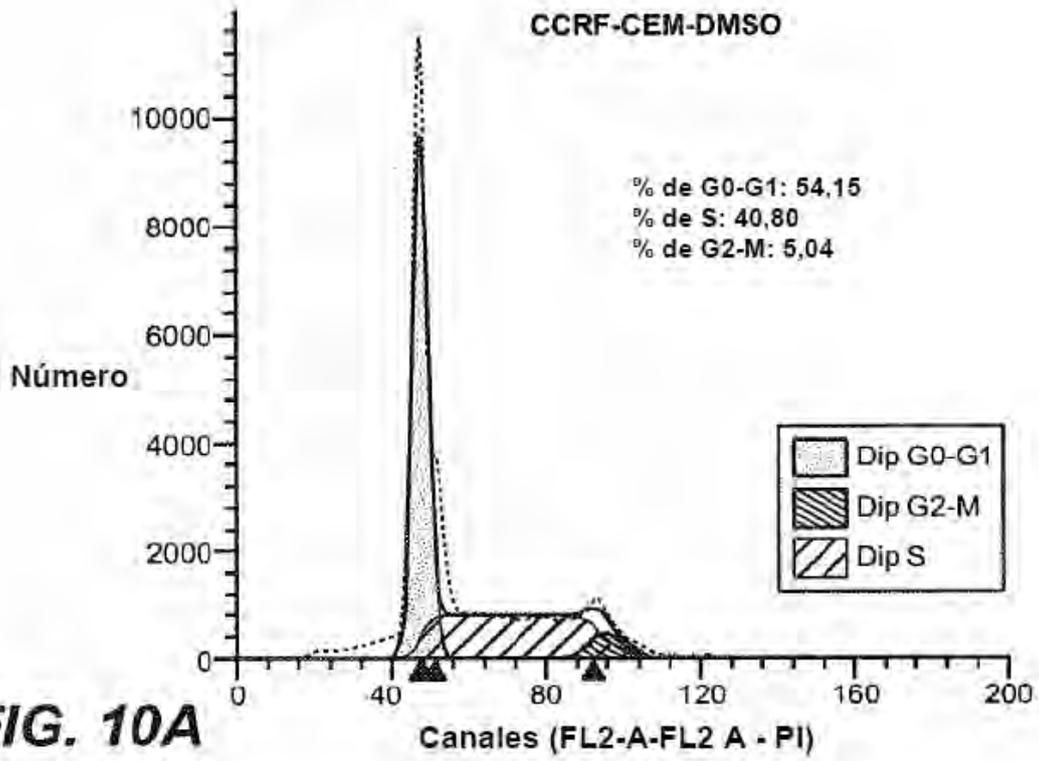


FIG. 10A

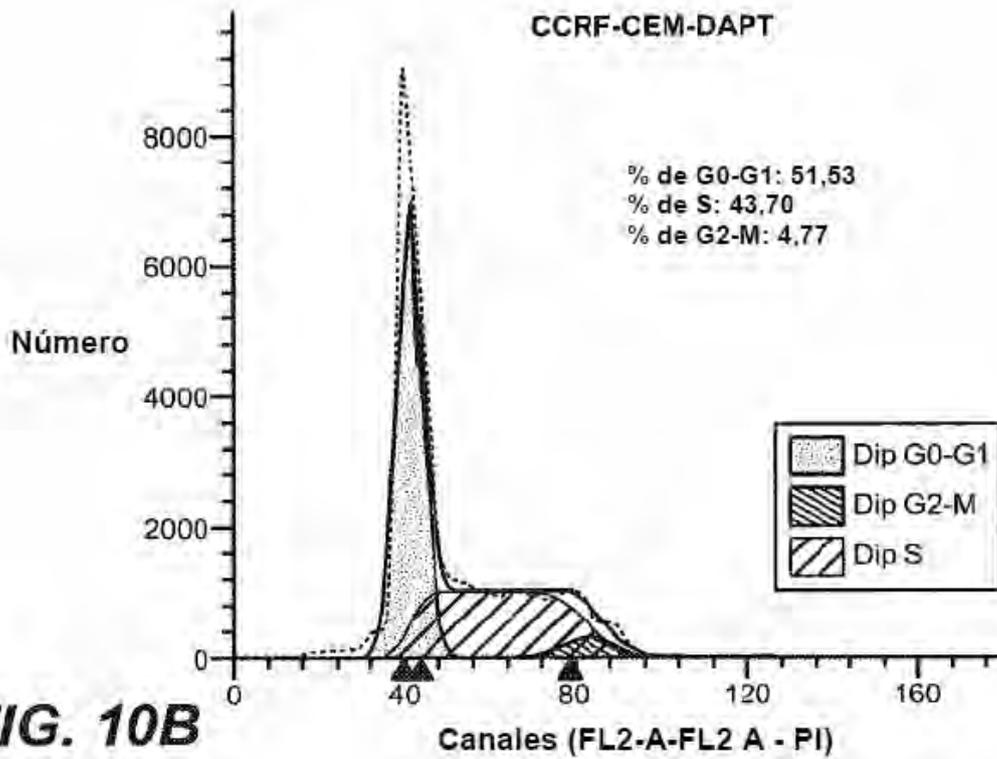
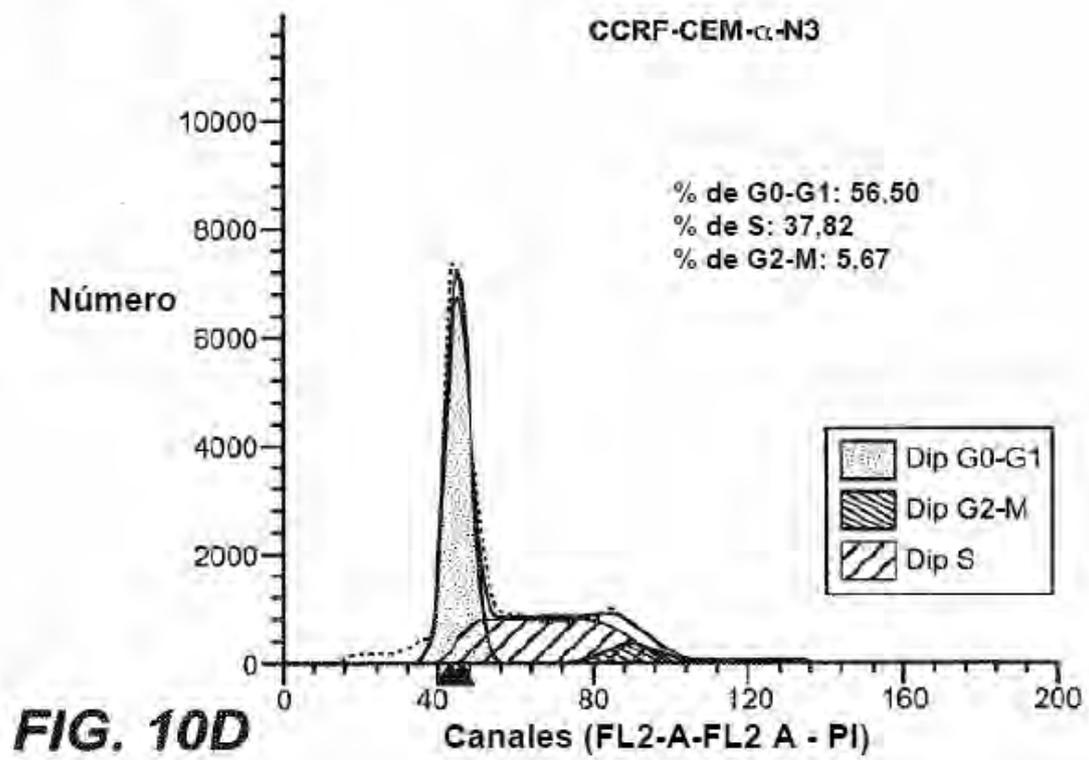
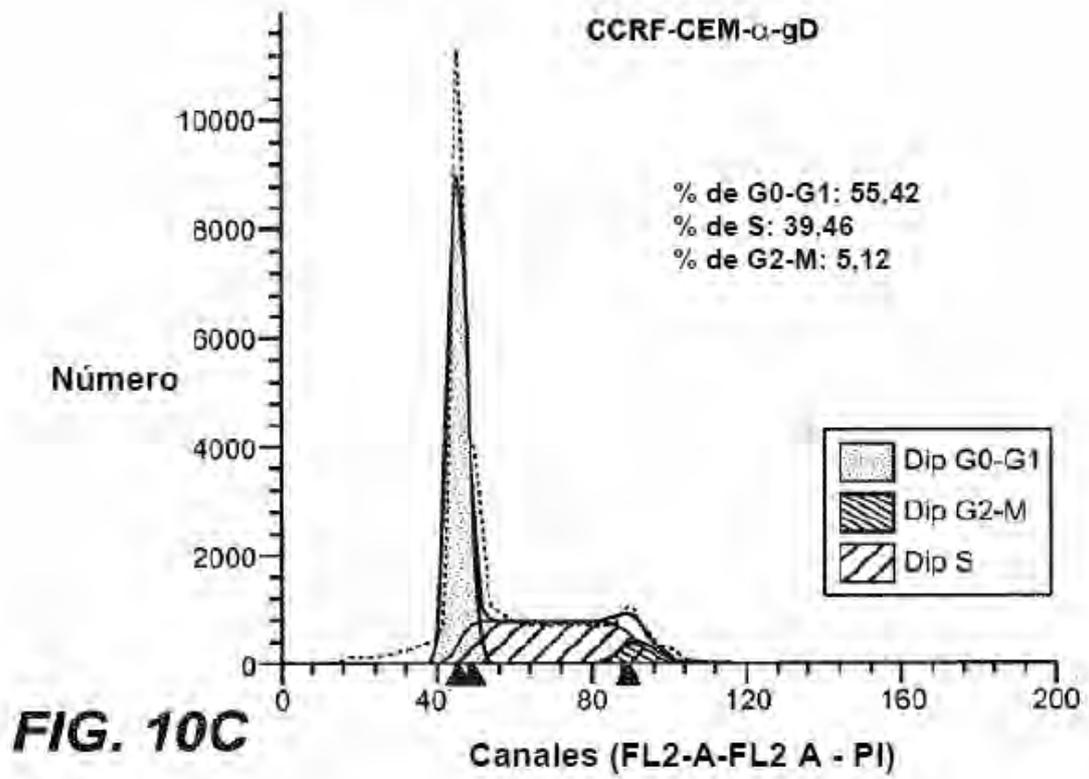
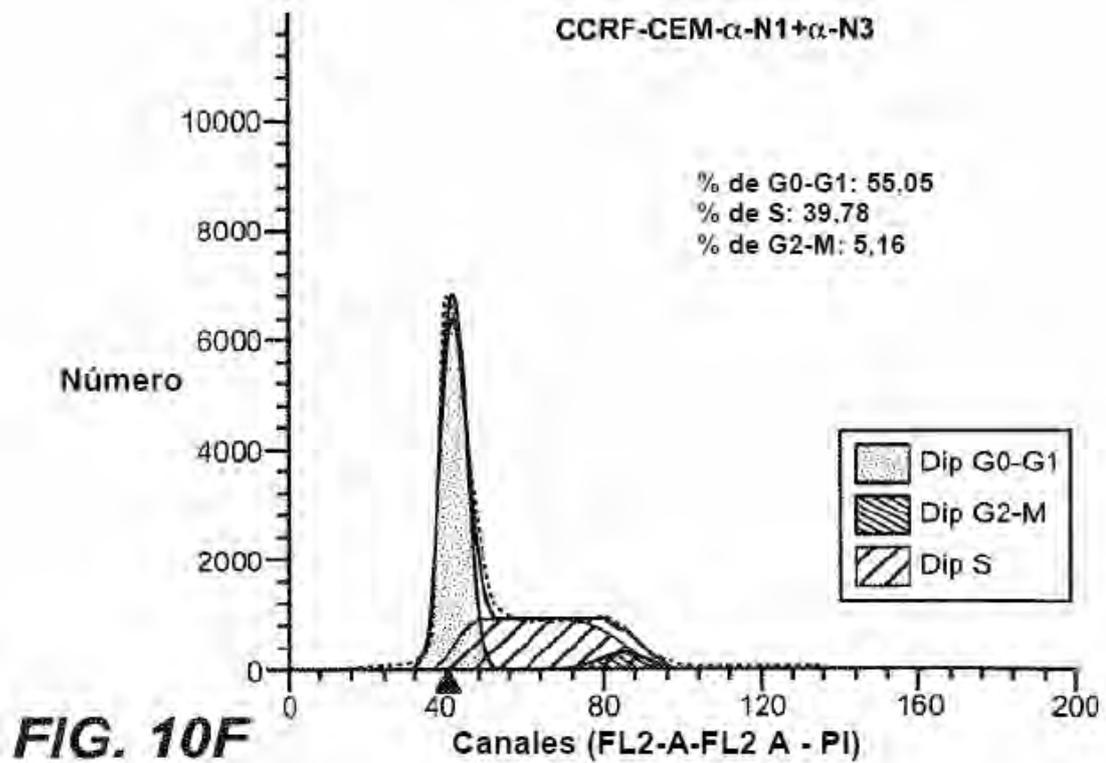
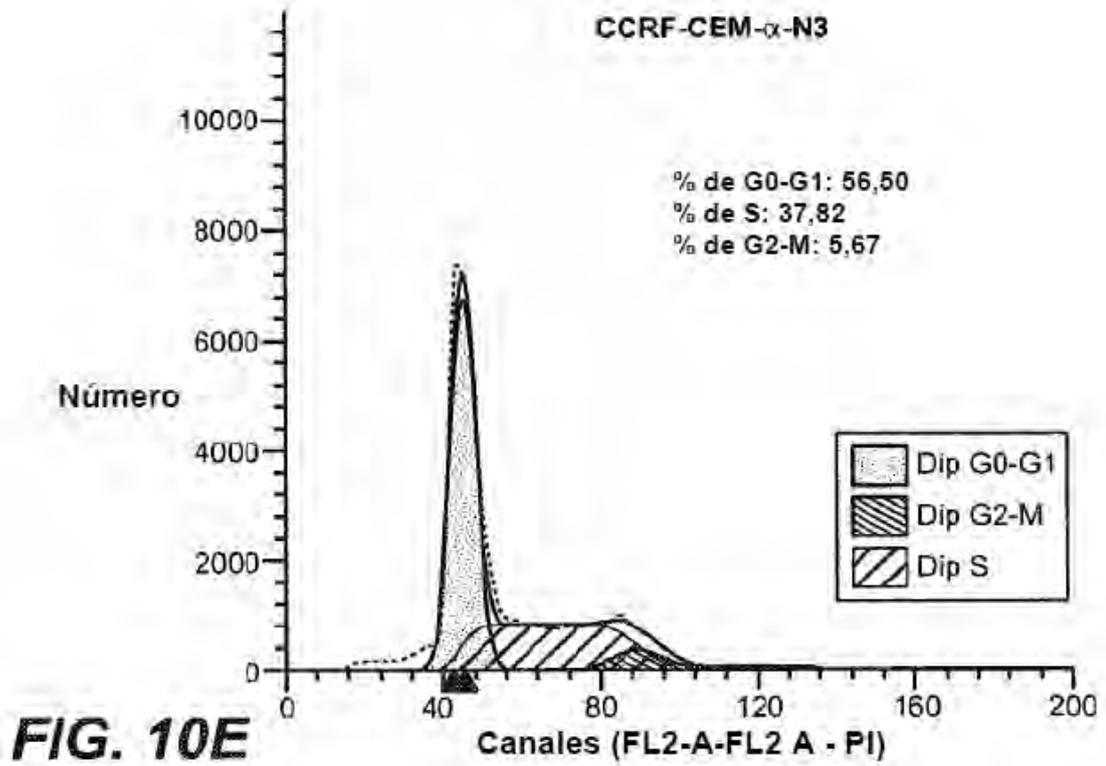


FIG. 10B





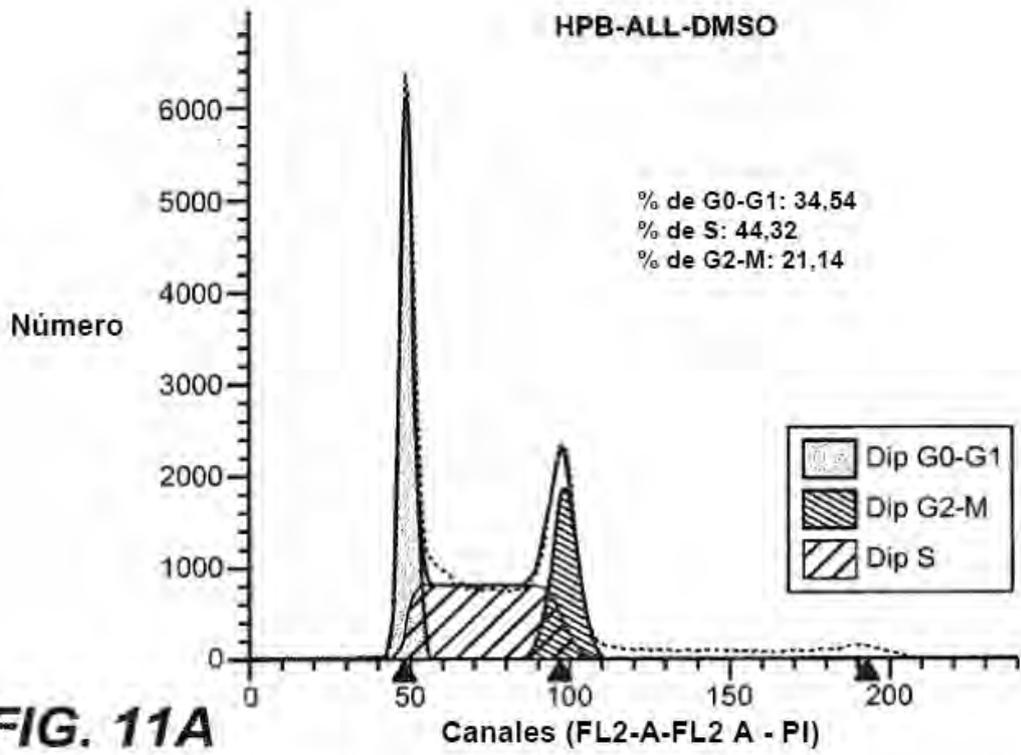


FIG. 11A

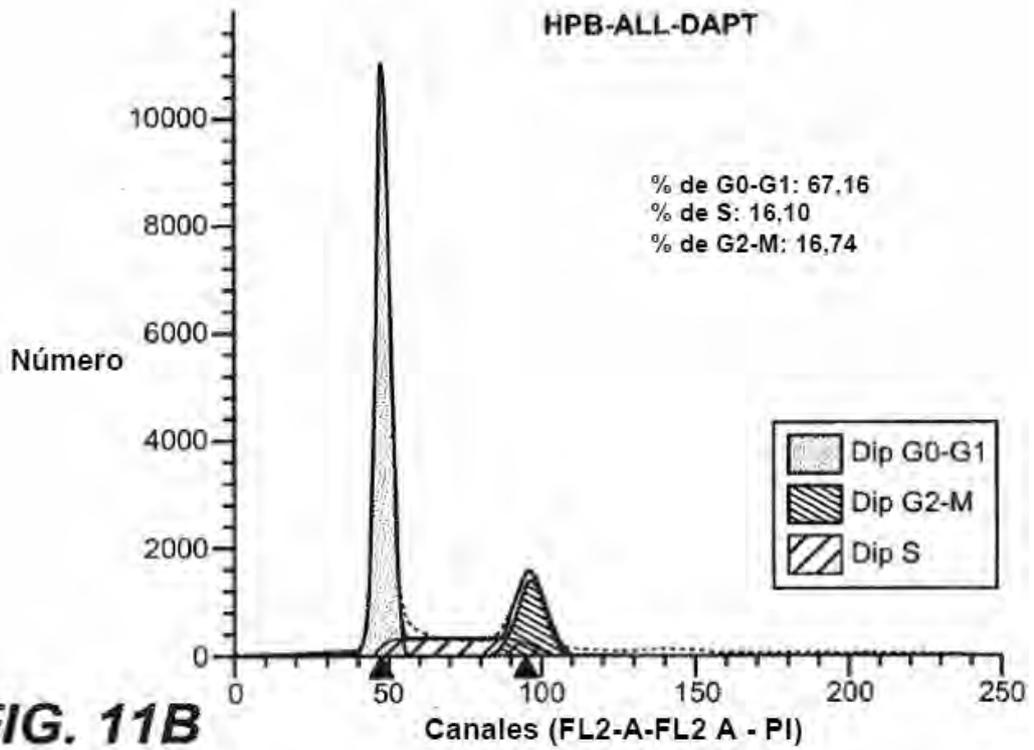


FIG. 11B

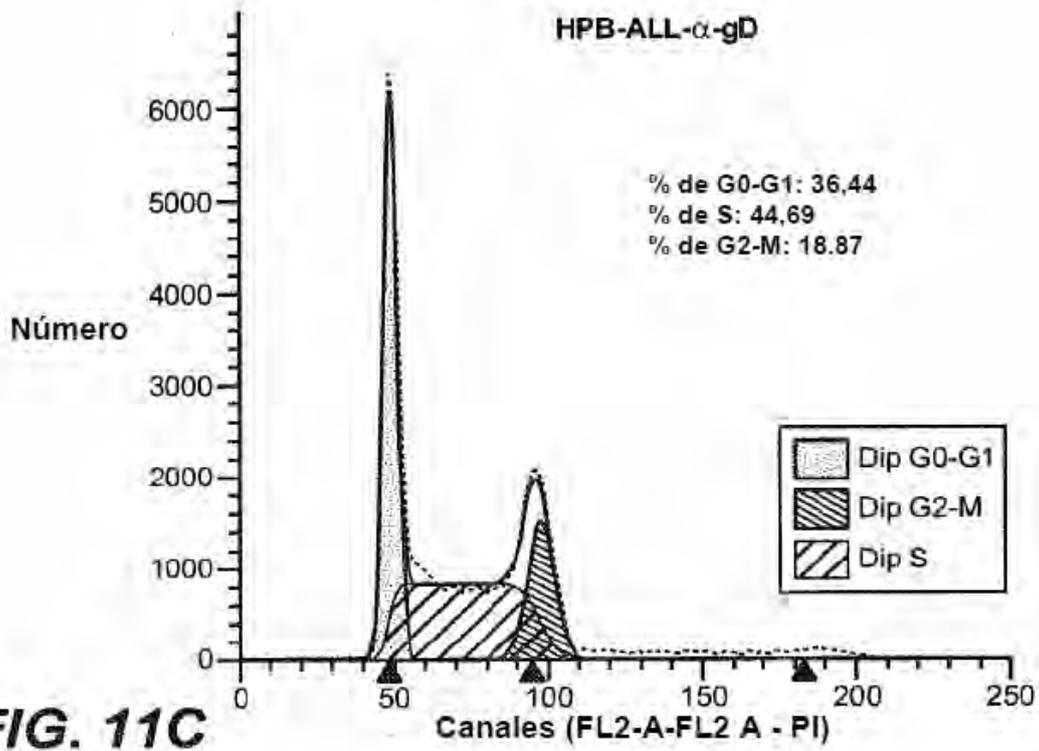


FIG. 11C

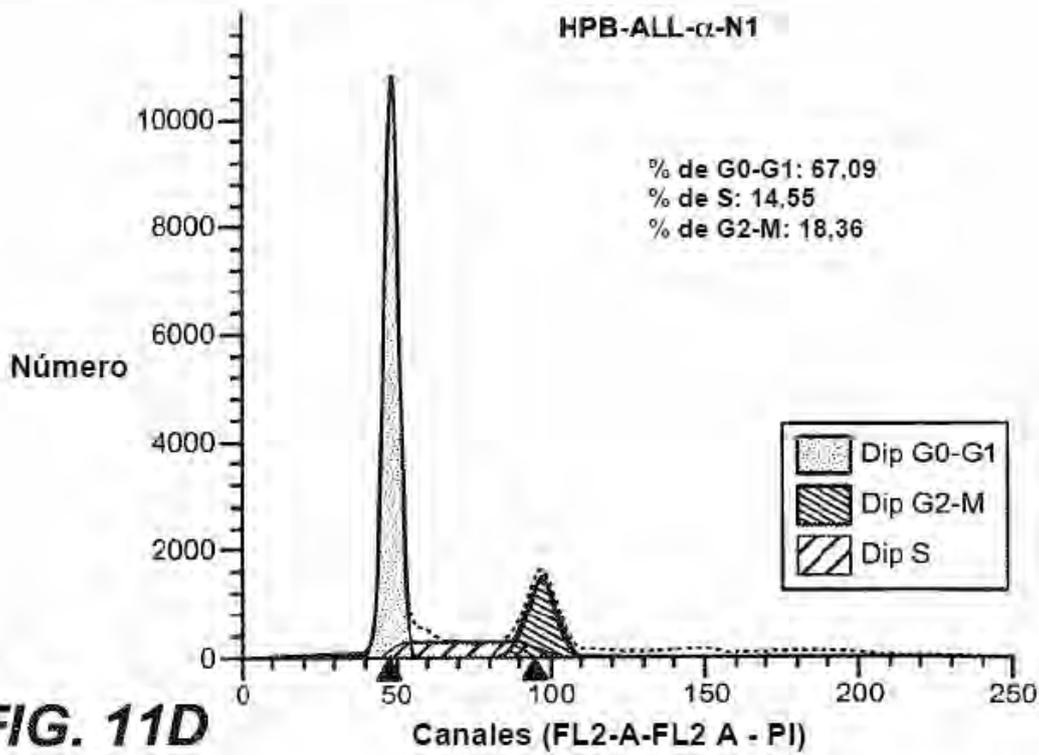
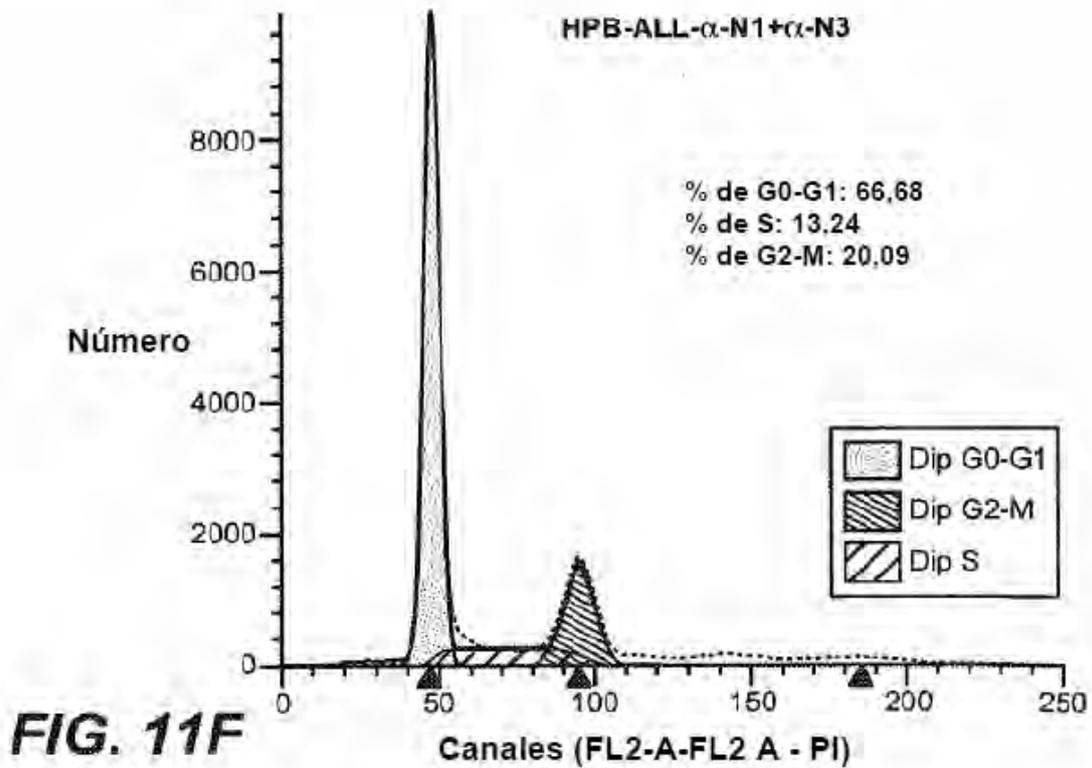
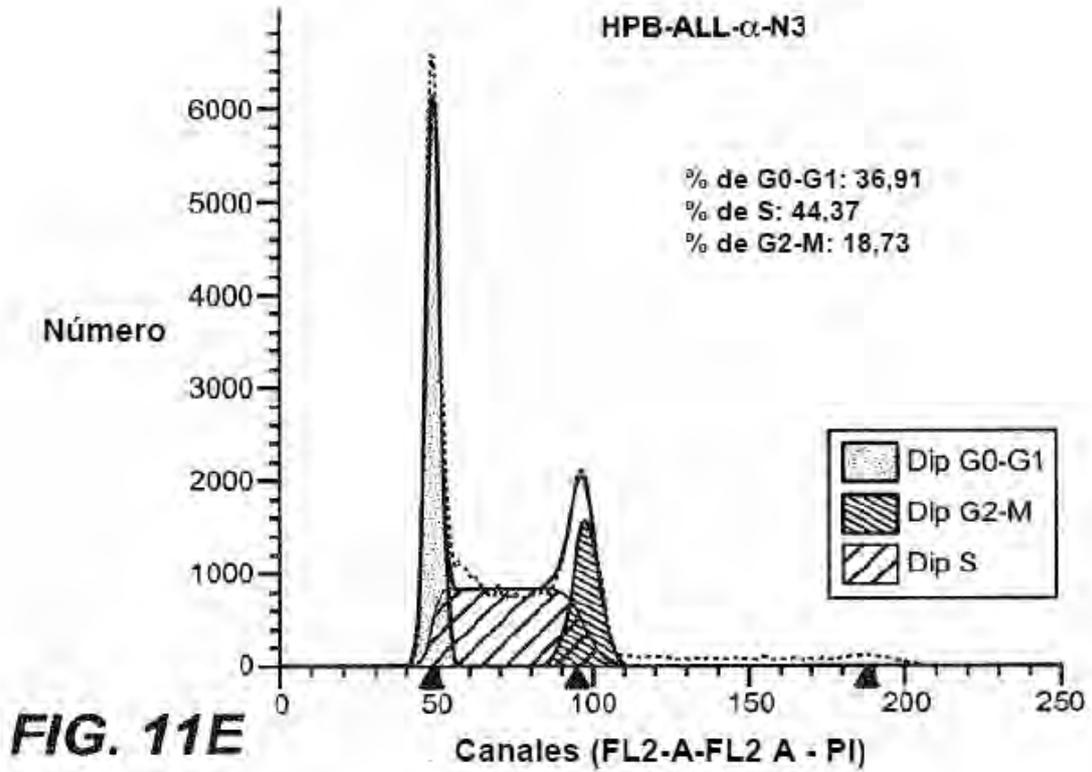


FIG. 11D



Activación dependiente del ligando de Notch3
en células MDA-MB-468

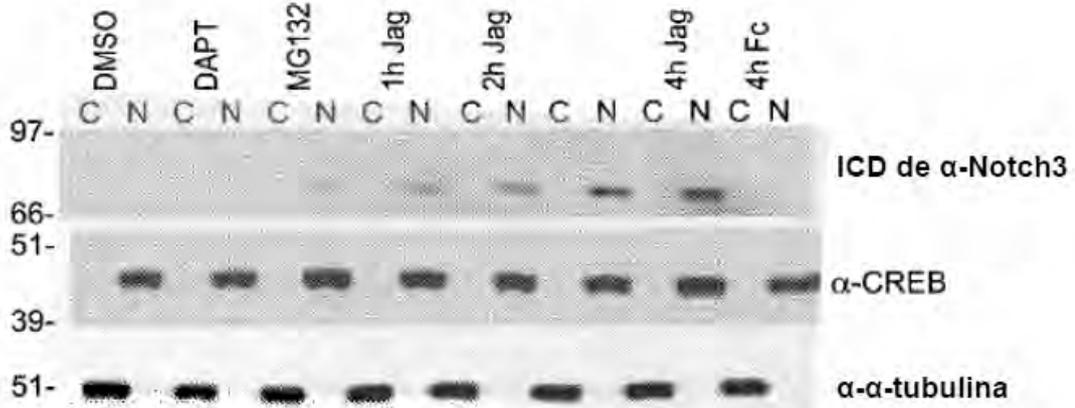


FIG. 12

Notch1 y Notch3 activadas en células TALL

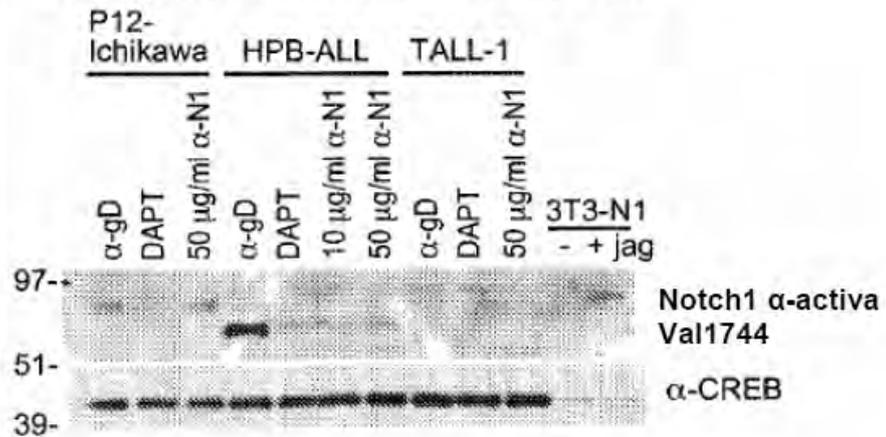
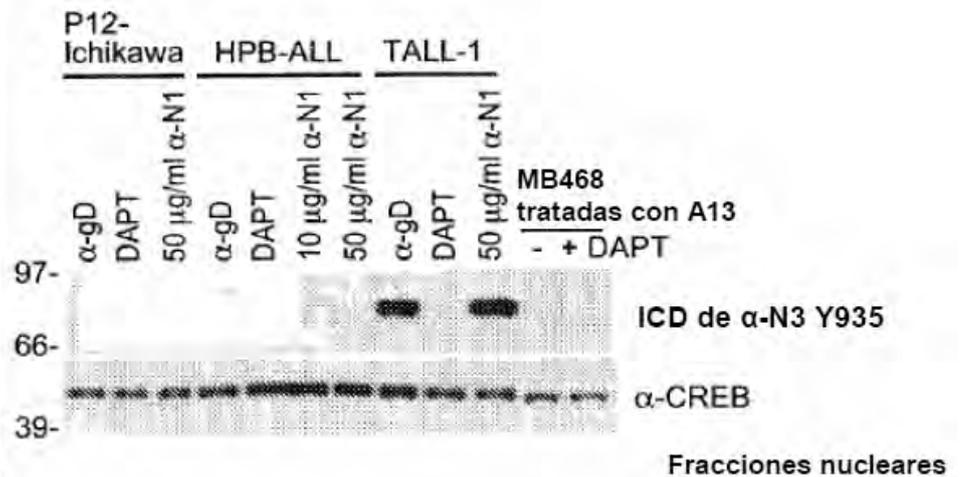


FIG. 13



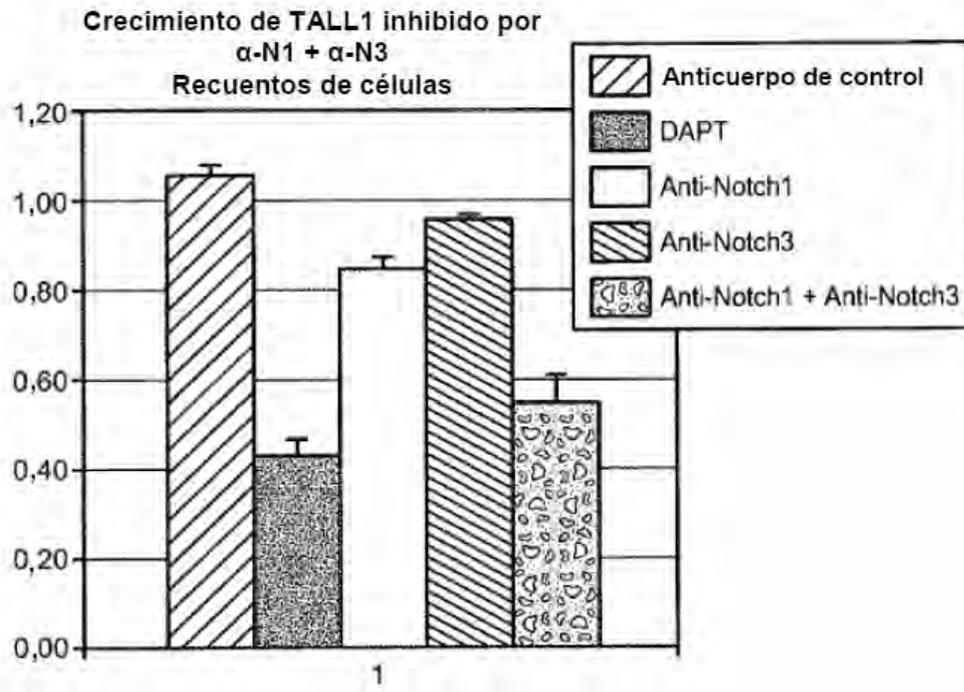


FIG. 14