

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 206**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2007 E 07844405 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2087006**

54 Título: **Anticuerpos agonistas anti-Notch3 y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con Notch3**

30 Prioridad:

19.10.2006 US 852861 P

06.01.2007 US 879218 P

18.12.2006 US 875597 P

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

04.10.2016

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

LI, KANG;

ZHOU, BIN-BING STEPHEN;

WU, WENJUAN;

FUNG, SEK CHUNG y

SINGH, SANJAYA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 585 206 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 agonistas anti-Notch3 y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con Notch3

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos agonistas anti-Notch3 y a su uso en la mejora, tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con Notch3.

10 **Antecedentes de la invención**

El gen *Notch* se describió por primera vez en 1917 cuando se descubrió que una cepa de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* tenía muescas en las hojas de las alas (Morgan, Am Nat 51:513 (1917)). El gen se clonó casi setenta años después y se determinó que era un receptor de superficie celular que desempeña un papel clave en el desarrollo de muchos tipos celulares y tejidos diferentes en *Drosophila* (Wharton *et al.*, Cell 43:567 (1985)).

Se descubrió en seguida que la ruta de señalización de Notch era un mecanismo de señalización mediado por contacto celular-célula y se ha conservado evolutivamente de *Drosophila* a seres humanos. Se ha descubierto que los receptores de Notch están implicados en muchos procesos celulares, tales como diferenciación, decisiones de destino celular, mantenimiento de células madre, motilidad celular, proliferación, y apoptosis en diversos tipos celulares durante el desarrollo y la homeostasis tisular (véase la revisión de Artavanis-Tsakonas, *et al.*, Science 268:225 (1995)).

Los mamíferos poseen cuatro proteínas receptoras de Notch (denominadas *Notch1* a *Notch4*) y cinco ligandos correspondientes (denominados Delta Like-1 (DLL-1), Delta Like-3 (DLL-3), Delta Like-4 (DLL-4), Jagged-1 y Jagged-2). Los genes de receptores de Notch de mamífero codifican proteínas de ~300 kD que se escinden durante su transporte a la superficie celular y existen como heterodímeros. La parte extracelular del receptor Notch tiene treinta y cuatro repeticiones de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y tres repeticiones Notch/LIN12 ricas en cisteína. La asociación de dos subunidades escindidas está mediada por secuencias situadas inmediatamente N-terminales y C-terminales del sitio de escisión, y estas dos subunidades constituyen los dominios de heterodimerización (HD) de Notch (Wharton, *et al.*, Cell 43:567 (1985); Kidd, *et al.*, Mol Cell Biol 6:3431 (1986); Kopczynski, *et al.*, Genes Dev 2:1723 (1988); Yochem, *et al.*, Nature 335:547 (1988)).

Actualmente, aún no está claro el modo en que está regulada la señalización de Notch por diferentes receptores o el modo en que los cinco ligandos difieren en su señalización o regulación. Las diferencias en la señalización y/o regulación pueden estar controladas por sus patrones de expresión en diferentes tejidos o por diferentes indicios ambientales. Se ha documentado que las proteínas de ligando de Notch, incluyendo Jagged/Serrate y Delta/Delta-like, se unen específicamente a la región de repetición EGF e inducen la señalización de Notch mediada por receptor (revisado por Bray, Nature Rev Mol Cell Biol. 7:678 (2006), y por Kadesch, Exp Cell Res. 260:1 (2000)). Entre las repeticiones EGF, las repeticiones 10^a a 12^a son necesarias para la unión del ligando al receptor Notch, y las otras repeticiones EGF pueden potenciar la interacción receptor-ligando (Xu, *et al.*, J Biol Chem. 280:30158 (2005); Shimizu, *et al.*, Biochem Biophys Res Comm. 276:385 (2000)). Aunque las repeticiones LIN12 y el dominio de dimerización no están directamente implicados en la unión a ligando, desempeñan papeles importantes en el mantenimiento del complejo proteico heterodimérico, evitando la escisión por proteasa independiente de ligando y la activación del receptor (Sanche-Irizarry, *et al.*, Mol Cell Biol. 24:9265 (2004); Vardar *et al.*, Biochem. 42:7061 (2003)).

Las células madre normales de muchos tejidos incluyendo células madre intestinales y neuronales dependen de la señalización de Notch para la auto-renovación y determinación del destino (Fre, *et al.*, Nature, 435: 964 (2005); van Es, *et al.*, Nature, 435: 959 (2005); Androutsellis-Theotokis, *et al.*, Nature, 442: 823 (2006)). Por lo tanto, el anticuerpo agonista contra Notch3 podría tener aplicación en enfermedades degenerativas. CADASIL (arteriopatía dominante autosómica cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía) causa un tipo de apoplejía y demencia cuyas características clave incluyen eventos isquémicos subcorticales recurrentes y demencia vascular. Se ha descubierto que CADASIL está asociada con un gen mutante localizado en el cromosoma 19 (Joutel, *et al.*, Nature 383:707 (1996)). Joutel *et al.* identificaron mutaciones en pacientes con CADASIL que causan alteración grave del gen Notch 3, lo que indica que Notch3 podría ser la proteína defectuosa en pacientes con CADASIL. Desafortunadamente, ésta enfermedad altamente discapacitante y a menudo letal ha permanecido durante mucho tiempo sin diagnosticar o mal diagnosticada como esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer. Los estudios actuales tenderían a demostrar que esta es una afección que está mucho más extendida de lo que se creía en un principio.

Un ejemplo adicional de una enfermedad relacionada con Notch 3 es migraña hemipléjica familiar (FHM), la forma autosómica dominante de migraña con aura, localizada en la misma región del cromosoma 19 que el gen Notch3. Debe apreciarse que más del 30 % de los pacientes que padecen CADASIL también padecen migrañas con aura. Sin embargo, lo último se observa en solamente aproximadamente el 5 % de la población y esta observación condujo al descubrimiento de la implicación del gen Notch3 en el mecanismo de esta afección. Asimismo, la ataxia

paroxística familiar se ha vinculado a un gen localizado en la misma región del cromosoma 19 y se ha implicado Notch3 en esta afección. Otras afecciones y enfermedades que se han ligado a Notch3 incluyen síndrome de Alagille (Flynn, *et al.*, J Pathol 204:55 (2004)).

5 Los estudios de investigación en curso están actualmente persiguiendo la identificación de otras enfermedades y afecciones ligadas a la expresión y/o deficiencias de señalización de Notch3. En vista de la gran cantidad de enfermedades humanas asociadas con la ruta de señalización de Notch 3, es importante que se identifiquen nuevos modos de prevención y tratamiento de estas enfermedades. La invención actual proporciona nuevos anticuerpos agonistas anti-Notch 3 útiles para esta necesidad médica no satisfecha.

10

Sumario de la invención

La presente invención proporciona novedosos anticuerpos agonistas y fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un epítipo del receptor humano de Notch3 en el dominio LIN12 como se define en las reivindicaciones. Otro aspecto de la descripción incluye el sitio de unión a epítipo y anticuerpos que se unen a este mismo epítipo que los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención activan la señalización mediada por Notch3 a través del receptor Notch3 independiente de unión a ligando.

15

La descripción incluye las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable de los anticuerpos y sus secuencias correspondientes de ácido nucleico. Otra realización de la descripción incluye las secuencias CDR de estos anticuerpos.

20

Otra realización de la presente invención incluye las líneas celulares y vectores que albergan las secuencias de anticuerpo de la presente invención como se define en las reivindicaciones.

25

La presente descripción también incluye el epítipo reconocido por los anticuerpos agonistas de la invención. La presente invención incluye anticuerpos que se unen a este epítipo como se define en las reivindicaciones. La descripción incluye un epítipo de Notch 3 que comprende el dominio Lin 12 que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10. Más particularmente, el epítipo de Notch 3 comprende la SEQ ID NO: 11. La presente invención incluye anticuerpos agonistas que se unen a este epítipo como se define en las reivindicaciones.

30

Otra realización de la presente invención es el uso de estos anticuerpos para la preparación de un medicamento o composición para el tratamiento de enfermedades relacionadas con Notch 3 y trastornos asociados con, por ejemplo, la inactivación del receptor.

35

Otra realización de la presente invención es el uso de estos anticuerpos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con Notch 3 o trastornos asociados con, por ejemplo, la inactivación del receptor, que comprende la activación de dichos defectos por, por ejemplo, activación de la señalización de Notch 3 independiente de la unión a ligando. Los trastornos relacionados con Notch 3 pueden incluir, aunque sin limitación, CADASIL, migraña hemipléjica familiar (FHM), ataxia paroxística familiar, síndrome de Alagille y otras enfermedades degenerativas.

40

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de Notch3. La región de repetición EGF se extiende desde el resto de aminoácido 43 hasta 1383; el dominio LIN12 se extiende desde el resto de aminoácido 1384 hasta 1503; y el dominio de dimerización se extiende desde el resto de aminoácido 1504 hasta 1640.

La Figura 2 (A-H) representa la comparación de secuencia de aminoácidos entre Notch 1, Notch 2, Notch 3, y Notch 4 humana.

50

La Figura 3 representa el porcentaje de identidad de Notch 1, Notch 2, Notch 3, y Notch 4.

Las Figuras 4A y 4B representan las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal anti-Notch3 MAb 256A-13 (SEQ ID NO: 2), con las regiones CDR subrayadas.

La Figura 5 representa un ensayo de indicador luciferasa del Ejemplo 5 que muestra los efectos activadores por MAb anti-Notch3 sobre el receptor Notch3.

55

La Figura 6 representa el impacto de anticuerpos agonistas contra Notch3 sobre la escisión por metaloproteasa de Notch3.

La Figura 7 representa construcciones de proteína de fusión Notch3-Fc para el mapeo de epítopos del sitio de unión de 256A-13.

La Figura 8 representa la comparación de la secuencia codificante del péptido líder de Notch3 modificado por ingeniería con la secuencia codificante del péptido líder de Notch3 nativa (N.º de acceso a NCBI GenBank NM_000435) que muestra los cambios de nucleótidos (8A) y la secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia del péptido líder de Notch modificado por ingeniería (8B). La Figura 8C representa el dominio LIN 12 y 8D representa un epítipo de subdominio de LIN12.

60

La Figura 9 representa la generación de una construcción de intercambio de dominios por el método de PCR-SOE. Las barras en flecha representan los cebadores de PCR. La barra abierta, la secuencia de Notch3. La barra rellena, la secuencia de Notch1.

65

La Figura 10 representa las secuencias de aminoácidos usadas en el mapeo de epítomos del dominio LIN12 de Notch3 del MAb 256A-13.

La Figura 11 representa los péptidos de exploración con alanina para el mapeo de epítomos lineales de 256A-13.

5 Descripción detallada

Esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, líneas celulares, vectores o reactivos particulares descritos en este documento porque pueden variar. Además, la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares solamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una", y "el", "la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario, por ejemplo, una referencia a "una célula hospedadora" incluye una pluralidad de dichas células hospedadoras. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usado en este documento tienen los mismos significados que los comprendidos habitualmente por un experto en la materia en el campo de la invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica de la presente invención, se describen en este documento métodos, dispositivos y materiales a modo de ejemplo.

Definiciones

20 Los términos usados durante toda esta solicitud deben entenderse con el significado habitual y típico para los expertos en la materia. Sin embargo, los solicitantes desean que a los siguientes términos se les de la definición particular definida a continuación.

25 La expresión "sustancialmente idéntica" con respecto a una secuencia polipeptídica de cadena de anticuerpo puede entenderse como una cadena de anticuerpo que muestra al menos un 70 %, o un 80 %, o un 90 %, o un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de referencia. La expresión con respecto a una secuencia de ácido nucleico puede entenderse como una secuencia de nucleótidos que muestra al menos aproximadamente un 85 %, o un 90 %, o un 95 %, o un 97 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de referencia.

30 El término "identidad" u "homología" debe entenderse que indica el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos al resto de una secuencia correspondiente con la cual se compara, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad para la secuencia completa, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones ni las inserciones N- o C-terminales deben entenderse como reductoras de la identidad u homología. Son bien conocidos en la técnica métodos y programas informáticos para la alineación. La identidad de secuencia puede medirse usando un software de análisis de secuencia.

40 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos (Ab) y las inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Aunque los anticuerpos muestran especificidad de unión por una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad de diana. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. Los anticuerpos e inmunoglobulinas nativas son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo.

50 Como se usa en este documento, "anticuerpo anti-Notch3" significa un anticuerpo que se une específicamente a Notch3 humana de tal modo que activa la señalización de Notch 3 independiente de ligando.

55 El término "variable" en el contexto del dominio variable de anticuerpos, se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su diana particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3) también conocidas como regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones flanqueantes (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana de los anticuerpos (véase, Kabat, *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1987)).

Como se usa en este documento, la numeración de los restos de aminoácido de inmunoglobulina se hace de acuerdo con el sistema de numeración de restos de aminoácido de inmunoglobulina de Kabat, *et al.*, salvo que se indique lo contrario.

5 La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a la diana o variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos F(ab), F(ab'), F(ab')₂ y Fv. La expresión "fragmento funcional o análogo" de un anticuerpo es un compuesto que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-Notch3 es uno que puede unirse a un receptor Notch3 de tal modo que se evite o
10 reduzca sustancialmente la capacidad del receptor de unirse a sus ligandos o iniciar la señalización. Como se usa en este documento, "fragmento funcional" con respecto a anticuerpos, se refiere a fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')₂. Un fragmento "Fv" consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente (dímero V_H-V_L). Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a diana sobre la superficie del dímero V_H-V_L. De forma colectiva, las seis
15 CDR confieren especificidad de unión a la diana al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para una diana) tiene la capacidad de reconocer y unirse a la diana, aunque a una afinidad inferior que el sitio completo de unión.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencillo" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que el sFv forme la estructura deseada para la unión a la diana.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica. Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza que los dominios aparezcan con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno.

30 El fragmento F(ab) contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos F(ab') difieren de los fragmentos F(ab) por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen por escisión del enlace disulfuro en las cisteínas de la bisagra del producto de digestión con pepsina F(ab')₂. Se conocen acoplamiento químicos adicionales de fragmentos de anticuerpo para los expertos en la materia.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente en este documento anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpo, siendo el resto de la cadena o cadenas idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)). Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio diana. Además, en contraste con las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en la diana. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse por el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe entenderse como que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso con la presente invención pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas bien conocidas. Los anticuerpos monoclonales precursores a usarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, *et al.*, Nature 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos recombinantes.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a la diana de los anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de molde de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de un molde de inmunoglobulina humana elegido.

Los términos "célula", "línea celular", y "cultivo celular" incluyen descendencia. También tiene que entenderse que toda la descendencia puede no ser idéntica de forma precisa en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o propiedad biológica, detectada en la célula originalmente transformada. Las "células hospedadoras" usadas en la presente invención son generalmente hospedadores procariotas o eucariotas.

"Transformación" de un organismo celular, célula, o línea celular con ADN significa introducir ADN en la célula diana de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica. "Transfección" de una célula u organismo con ADN se refiere a la captación del ADN, por ejemplo, un vector de expresión, por la célula u organismo se exprese de hecho o no cualquier secuencia codificante. Las expresiones "célula hospedadora transfectada" y "transformada" se refiere a una célula en que se introdujo el ADN. La célula se llama "célula hospedadora" y puede ser procariota o eucariota. Células hospedadoras procariotas típicas incluyen diversas cepas de *E. coli*. Células hospedadoras eucariotas típicas son de mamífero, tales como de ovario de hámster chino o células de origen humano. La secuencia de ADN introducida puede ser de la misma especie que la célula hospedadora o una especie diferente de la célula hospedadora, o puede ser una secuencia híbrida de ADN, que contiene algo de ADN foráneo y algo de ADN homólogo.

El término "vector" significa una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está unida de forma funcional a una secuencia de control adecuada capaz de lograr la expresión del ADN en un hospedador adecuado. Dichas secuencias de control incluyen un promotor para lograr la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios adecuados de unión del ribosoma al ARNm, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula fágica, o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma del hospedador, o puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma. En la presente memoria descriptiva "plásmido" y "vector" a veces se usan de forma intercambiable, ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores que cumplen una función equivalente y que son, o llegarán a ser, conocidos en la técnica.

"Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo un ser humano, animales domésticos y de granja, primates no humanos, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

La palabra "marcador" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición detectable que puede conjugarse directa o indirectamente a una molécula o proteína, por ejemplo, un anticuerpo. El marcador puede ser detectable en sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Como se usa en este documento, "fase sólida" significa una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas englobadas en este documento incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado) polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad).

Como se usa en este documento, la expresión "trastorno mediado por Notch3" significa una afección o enfermedad que se caracteriza por un receptor defectuoso o subexpresado Notch3. Específicamente, se entendería que incluye afecciones asociadas con enfermedades degenerativas tales como CADASIL, FHM, ataxia paroxística familiar, síndrome de Alagille, y otras enfermedades degenerativas.

Inmunógeno del receptor Notch3 para la generación de anticuerpos

Pueden usarse dianas solubles o fragmentos de las mismas como inmunógenos para generar anticuerpos. El anticuerpo está dirigido contra la diana de interés. Preferiblemente, la diana es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede provocar un beneficio terapéutico en ese mamífero. Pueden usarse células completas como el inmunógeno para preparar los anticuerpos. El inmunógeno puede producirse de forma recombinante o prepararse usando métodos de síntesis. El inmunógeno también puede aislarse a partir de una fuente natural.

Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. Como alternativa, pueden usarse células que expresan en la molécula transmembrana como inmunógeno. Dichas células pueden obtenerse de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerosas) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para sobreexpresar la molécula transmembrana. Otras formas del inmunógeno útil para preparar los anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

Como alternativa, puede clonarse un gen o un ADNc que codifica el receptor humano de Notch3 en un plásmido u otro vector de expresión y expresarse en cualquiera de varios sistemas de expresión de acuerdo con métodos bien conocidos para los expertos en la materia. Los métodos de clonación y expresión del receptor Notch3 y la secuencia de ácido nucleico para el receptor humano de Notch3 son conocidos (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.821.332 y 5.759.546). A causa de la degeneración del código genético, puede usarse una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican la proteína o polipéptidos del receptor Notch3. Se puede variar la secuencia de nucleótidos seleccionando combinaciones basadas en elecciones posibles de codones. Estas combinaciones se hacen de acuerdo con el código genético convencional de tripletes, aplicado a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor Notch3 de origen natural y pueden considerarse todas estas variaciones. Uno cualquiera de estos polipéptidos puede usarse en la inmunización de un animal para generar anticuerpos que se unan al receptor humano de Notch3.

Las proteínas Notch3 recombinantes de otras especies también pueden usarse como inmunógeno para generar anticuerpos a causa del alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de Notch3. Una comparación entre Notch3 humana y de ratón mostró que más del 90 % de las secuencias de aminoácidos son idénticas entre las dos especies.

El receptor del inmunógeno Notch3 puede, cuando es beneficioso, expresarse como una proteína de fusión que tiene el receptor Notch3 unido a un segmento de fusión. El segmento de fusión a menudo ayuda en la purificación de la proteína, por ejemplo, permitiendo que la proteína de fusión se aisle y purifique por cromatografía de afinidad, pero también puede usarse para aumentar la inmunogenicidad. Pueden producirse proteínas de fusión cultivando una célula recombinante transformada con una secuencia de ácido nucleico de fusión que codifica una proteína que incluye segmento de fusión unido al extremo carboxilo y/o amino terminal de la proteína. Los segmentos de fusión pueden incluir, aunque sin limitación, regiones Fc de inmunoglobulina, glutatión S-transferasa, β -galactosidasa, un segmento de polihistidina capaz de unirse a un ion metálico divalente, y proteína de unión a maltosa.

La proteína recombinante del receptor Notch3 descrita en el Ejemplo 1 se usó para inmunizar ratones para generar los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Polipéptidos a modo de ejemplo comprenden toda o una parte de la SEQ ID NO. 1 o variantes de la misma.

Generación de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para los expertos en la materia (Harlow, *et al.*, *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988), que se incorpora por la presente en este documento por referencia en su totalidad).

Por ejemplo, puede administrarse un inmunógeno como se describe en el Ejemplo 1 a diversos animales hospedadores incluyendo, aunque sin limitación, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de suero que contenga anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración del inmunógeno puede implicar una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del hospedador, e incluyen, aunque sin limitación, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Los protocolos de inmunización son bien conocidos en la técnica y pueden realizarse por cualquier método que provoque una respuesta inmunitaria en el animal hospedador elegido. Los adyuvantes también son bien conocidos en la técnica.

Normalmente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) se inyecta en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o por vía intramuscular o a través de IV. El inmunógeno puede incluir un polipéptido Notch3, una proteína de fusión, o variantes del mismo. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, el porcentaje de hidrofobicidad, el porcentaje de hidrofiliidad, la estabilidad, la carga neta, el punto isoeléctrico, etc.), puede ser útil conjugar el inmunógeno con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Dicha conjugación incluye conjugación química por derivatización de grupos funcionales químicos activos con el inmunógeno y también la proteína inmunogénica a conjugarse de modo que se forme un enlace covalente, o a través de metodología basada en proteína de fusión, u otros métodos conocidos para los expertos en la materia. Ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, aunque sin limitación, hemocianina de lapa californiana, ovalbúmina, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja, y péptidos auxiliares T promiscuos. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica como se ha descrito anteriormente.

Los anticuerpos de la presente invención comprenden anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos que reconocen un único sitio antigénico. Su especificidad uniforme hace que los anticuerpos monoclonales sean mucho más útiles que los anticuerpos policlonales, que habitualmente contienen anticuerpos que reconocen diversos diferentes sitios antigénicos. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando tecnología de hibridoma, tales como los descritos por Kohler, *et al.*, Nature 256:495 (1975); patente de Estados Unidos n.º 4.376.110; Harlow, *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) y Hammerling, *et al.*, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier (1981), métodos de ADN recombinante, u otros métodos conocidos para los expertos en la materia. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, aunque sin limitación, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor, *et al.*, Immunology Today 4:72 (1983); Cole, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 (1983)), y la técnica de hibridoma EBV (Cole, *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pág. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el MAb de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

En el modelo de hibridoma, se inmuniza un hospedador tal como un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmunológico humano, hámster, conejo, camello, o cualquier otro animal hospedador apropiado, para producir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Los linfocitos después se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pág. 59-103 (1986)).

Generalmente, en la preparación de hibridomas productores de anticuerpos, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humanas. Los linfocitos después se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pág. 59-103 (1986)). Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino o humano. Normalmente, se emplea una línea celular de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que evitan el crecimiento de células HGPRT deficientes.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas líneas celulares de mieloma están las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. solicitud de Estados Unidos n.º, y células SP2/0 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Md. EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J Immunol 133:3001 (1984); Brodeur, *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pág. 51-63 (1987)). También puede usarse la línea celular de mieloma de ratón NSO (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, R.U.).

El medio de cultivo en que se cultivan las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra Notch3. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas son conocidas en la técnica y pertenecen a las habilidades de los expertos. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal a Notch3 puede determinarse, por ejemplo, por un análisis de Scatchard (Munson, *et al.*, Anal Biochem 107:220 (1980)).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pág. 59-103 (1986)). El medio de cultivo adecuado para este propósito incluye, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente o se aíslan del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Existen diversos métodos en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales y por tanto la invención no se limita a su única producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567. En este contexto, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un clon individual eucariota, fágico, o procariota. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos, o dichas cadenas de fuentes humanas, humanizadas, u otras fuentes) (Innis, *et al.* In PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic (1990), Sanger, *et al.*, Proc Natl Acad Sci 74:5463 (1977)). Las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células NS0, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de lo contrario proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en el lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)) o por unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar el entrecruzamiento de cadena pesada. Como alternativa, los restos relevantes de cisteína se sustituyen con otro resto de aminoácido o se delecionan para evitar el entrecruzamiento.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos por técnicas conocidas. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto, *et al.*, J Biochem Biophys Methods 24:107 (1992); Brennan, *et al.*, Science 229:81 (1985)). Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de una biblioteca de anticuerpos en fagos. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos F(ab')₂ SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter, *et al.*, BioTechnology 10:163 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv (Fv) de cadena sencilla (solicitud de patente PCT WO 93/16185).

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en que diferentes partes del anticuerpo se obtiene de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable obtenida de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi, *et al.*, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies, *et al.*, J Immunol Methods 125:191 (1989); patentes de Estados Unidos n.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397, que se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

Un anticuerpo humanizado se diseña para que tenga mayor homología con una inmunoglobulina humana que los anticuerpos monoclonales derivados de animales. La humanización es una técnica para preparar un anticuerpo quimérico donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y las regiones flanqueantes (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los restos flanqueantes en las regiones flanqueantes humanas se sustituirán con el correspondiente resto del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones en la región flanqueante se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los restos de CDR y flanqueantes para identificar restos flanqueantes importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencia para identificar restos flanqueantes inusuales en posiciones particulares. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.585.089; Riechmann, *et al.*, Nature 332:323 (1988), que se incorporan en este documento por referencia en sus totalidades. Los anticuerpos pueden humanizarse usando diversas técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239,400; publicación PCT WO 91/09967; patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585,089),

recubrimiento o revestimiento (documento EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28:489 (1991); Studnicka, *et al.*, *Protein Engineering* 7:805 (1994); Roguska, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969 (1994)), y reordenamiento de cadenas (patente de Estados Unidos n.º 5.565.332).

5 En líneas generales, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo de una fuente que no es humana. Estos restos no humanos de aminoácido a menudo se mencionan como restos "importados", que normalmente se recogen de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones, *et al.*, *Nature* 321:522 (1986); Riechmann, *et al.*, *Nature* 332:323 (1988); Verhoeyen, *et al.*, *Science* 239:1534 (1988)), sustituyendo CDR o secuencias de CDR
10 no humanas por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en que algunos restos de CDR y algunos posibles restos de FR están sustituidos de los sitios análogos en anticuerpos de roedor.

15 Es adicionalmente importante que los anticuerpos humanizados retengan mayor afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y
20 humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están habitualmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de ciertos restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de las
25 secuencias de inmunoglobulina candidatas, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse restos FR y combinarse a partir de las secuencias receptora e importada de modo que la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana, se maximice, aunque son los restos CDR los que influyen directamente y muy sustancialmente sobre la unión al antígeno.

30 La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usarse en la preparación de anticuerpos humanizados es importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo no humano se explora frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que está más cercana a la del anticuerpo precursor no humano entonces se acepta como la FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims, *et al.*, *J Immunol* 151:2296 (1993); Chothia, *et al.*, *J Mol Biol* 196:901 (1987)). Otro método usa una región flanqueante particular obtenida de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región flanqueante puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285 (1992); Presta, *et al.*, *J Immunol* 151:2623 (1993)).

40 Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Pueden prepararse anticuerpos humanos por diversos métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también, las patentes de Estados Unidos n.º 4.444.887 y
45 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741; cada una de las cuales se incorporan en este documento por referencia en su totalidad. Las técnicas de Cole, *et al.* y Boerder, *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Riss (1985); y Boerner, *et al.*, *J Immunol* 147:86 (1991)).

50 Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, pueden introducirse complejos génicos de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable, región constante y región de diversidad humana pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de ratón de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan
55 en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos después se cruzan para producir descendencia homocigótica que exprese anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Jakobovitis, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2551 (1993); Jakobovitis, *et al.*, *Nature* 362:255 (1993); Bruggermann, *et al.*, *Year in Immunol* 7:33 (1993); Duchosal, *et al.*, *Nature* 355:258 (1992)). Jakobovitis, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2551 (1993); Jakobovitis, *et al.*, *Nature* 362:255 (1993); Bruggermann, *et al.*, *Year in Immunol* 7:33 (1993); Duchosal, *et al.*, *Nature* 355:258 (1992)). Los ratones transgénicos se inmunizan del modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos

5 contra el antígeno a partir de ratones transgénicos, inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión global de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg, *et al.*, *Int Rev Immunol* 13:65-93 (1995). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente Europea n.º 0 598 877; las patentes de Estados Unidos 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598, que se incorporan por referencia en este documento en su totalidad. Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San José, Calif.), y Medarex, Inc. (Princeton, N.J.) pueden contratarse para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

15 También podrían prepararse MAb humanos inmunizando ratones trasplantados con leucocitos de sangre periférica humana, esplenocitos o médula ósea (por ejemplo, técnicas Trioma de XTL). Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado usando una técnica mencionada como "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo (Jespers, *et al.*, *Biotechnology* 12:899 (1988)).

25 Además, pueden utilizarse anticuerpos contra los polipéptidos de la invención, a su vez, para generar anticuerpos antiidiotipo que "imiten" polipéptidos de la invención usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Greenspan, *et al.*, *FASEB J* 7:437 (1989); Nissinoff, *J Immunol* 147:2429 (1991)). Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que se unen a e inhiben competitivamente la multimerización polipeptídica y/o unión de un polipéptido de la invención a un ligando para generar antiidiotipos que "imiten" el dominio de multimerización y/o unión del polipéptido, y, como consecuencia, se unan a y neutralicen el polipéptido y/o su ligando. Dichos antiidiotipos neutralizantes o fragmentos Fab de dichos antiidiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando polipeptídico. Por ejemplo, dichos anticuerpos antiidiotipo pueden usarse para unirse a un polipéptido de la invención y/o para unirse a sus ligandos/receptores, y bloquear de ese modo su actividad biológica.

35 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. La presente invención, una de las especificidades de unión puede estar dirigida hacia Notch3, la otra puede ser para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína de superficie celular, receptor, subunidad de receptor, antígeno específico de tejido, proteína derivada de virus, proteína de envuelta codificada por virus, proteína derivada de bacteria, o proteína de superficie bacteriana, etc.

40 Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son bien conocidos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein, *et al.*, *Nature* 305:537 (1983)). A causa de la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se consigue habitualmente por etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Trauneker, *et al.*, *EMBO J* 10:3655 (1991).

45 Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra CH2, y CH3. Puede tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión diferentes, y se cotransforman en un organismo hospedador adecuado. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh, *et al.*, *Meth In Enzym* 121:210 (1986).

50 También se contemplan anticuerpos heteroconjugados por la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunológico a células indeseadas (patente de Estados Unidos n.º 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de síntesis de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéster. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980.

Además, se pueden generar anticuerpos de un único dominio contra Notch3. Ejemplos de esta tecnología se han descrito en el documento WO9425591 para anticuerpos derivados de Ig de cadena pesada de Camelidae, así como en el documento US20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos completamente humanos de un único dominio a partir de bibliotecas en fagos.

También se pueden crear moléculas de unión de una única cadena peptídica en que están conectadas las regiones Fv de cadena pesada y ligera. Los anticuerpos de cadena sencilla ("scFv") y el método de su construcción se describen en la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778. Como alternativa, puede construirse Fab y expresarse por medios similares. Todos los anticuerpos, completa y parcialmente humanos son menos inmunogénicos que los MAb completamente murinos, y los fragmentos y anticuerpos de cadena sencilla también son menos inmunogénicos.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty, *et al.*, Nature 348:552 (1990). Clarkson, *et al.*, Nature 352:624 (1991) y Marks, *et al.*, J Mol Biol 222:581 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas en fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por reordenamiento de cadenas (Marks, *et al.*, Bio/Technology 10:779 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas en fagos muy grandes (Waterhouse, *et al.*, Nuc Acids Res 21:2265 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en el lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)).

Otra alternativa es usar fusión eléctrica en lugar de fusión química para formar hibridomas. Esta técnica está bien establecida. En lugar de la fusión, se puede transformar una célula B para hacerla inmortal usando, por ejemplo, un virus de Epstein Barr, o un gen transformante. Véase, por ejemplo, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity," Zurawaki, *et al.*, en Monoclonal Antibodies, ed. de Kennett, *et al.*, Plenum Press, pág. 19-33. (1980). Pueden crearse MAb anti-Notch3 inmunizando roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres y cobayas) con proteína Notch3, proteína de fusión o sus fragmentos expresados por sistemas eucariotas o procariotas. Pueden usarse otros animales para la inmunización, por ejemplo, primates no humanos, ratones transgénicos de expresión de inmunoglobulinas y ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) trasplantados con linfocitos B humanos. Pueden generarse hibridomas por procedimientos convencionales fusionando linfocitos B de los animales inmunizados con células de mieloma (por ejemplo, Sp2/0 y NSO), como se ha descrito previamente (Köhler, *et al.*, Nature 256:495 (1975)). Además, pueden generarse anticuerpos anti-Notch3 explorando bibliotecas recombinantes de Fv de cadena sencilla o Fab de linfocitos B humanos en sistemas de presentación en fagos. La especificidad de los MAb por Notch3 puede ensayarse por ELISA, inmunotransferencia de Western u otras técnicas inmunoquímicas. La actividad inhibidora de los anticuerpos sobre la activación competente puede evaluarse por ensayos hemolíticos, usando RBC sensibilizadas de pollo u oveja para la ruta clásica del complemento. Los hibridomas en los pocillos positivos se clonan por dilución limitante. Los anticuerpos se purifican para caracterización para su especificidad por Notch3 humana por los ensayos descritos anteriormente.

45 Identificación de anticuerpos anti-Notch3

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales agonistas que activan la señalización mediada por Notch3 independiente de ligando. En particular, los anticuerpos de la presente invención se unen a y activan Notch3. Los anticuerpos de la presente invención incluyen el anticuerpo denominado 256A-13. La presente descripción también incluye anticuerpos que se unen al mismo epítipo que 256A-13.

Se ensayaron anticuerpos anti-Notch3 candidatos por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia de Western u otras técnicas inmunoquímicas. Los ensayos realizados para caracterizar los anticuerpos individuales se describen en los Ejemplos.

Los anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multispecíficos, humanos, humanizados, o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un único dominio, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotipo (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

Los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humano de la presente invención e incluye, aunque sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla Fv unidos por disulfuro (sdFv) y anticuerpos de un único dominio que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de las siguientes: región bisagra,

dominios CH1, CH2, y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2, y CH3. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son de ser humano, primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratones y ratas), burros, ovejas, conejos, cabras, cobayas, camellos, caballos o pollos.

Como se usa en este documento, "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe *infra* y, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.939.598 de Kucherlapati, *et al.*

Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de Notch3 o pueden ser específicos tanto para Notch3 como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, J Immunol 147:60 (1991); las patentes de Estados Unidos n.º 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny, *et al.*, J Immunol 148:1547 (1992).

Los anticuerpos pueden describirse o especificarse en término del epítipo o epítopos o parte o partes de Notch3 que reconocen o a las que se unen específicamente. El epítipo o epítopos o parte o partes del polipéptido pueden especificarse como se describe en este documento, por ejemplo, por las posiciones N-terminal y C-terminal, por el tamaño en los restos contiguos de aminoácido, o como se enumera en las Tablas y Figuras.

Los anticuerpos también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Los anticuerpos que se unen a polipéptidos Notch3, que tienen al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 %, al menos un 60 %, al menos un 55 %, y al menos un 50 %, de identidad (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento) con Notch3 también se incluyen en la presente descripción. Los anticuerpos anti-Notch3 también pueden unirse con una K_D de menos de aproximadamente 10^{-7} M, menos de aproximadamente 10^{-6} M, o menos de aproximadamente 10^{-5} M para otras proteínas, tales como anticuerpos anti-Notch3 de especies diferentes a aquella contra la que está dirigido el anticuerpo anti-Notch3.

En realizaciones específicas, los anticuerpos reaccionan de forma cruzada con homólogos de mono de Notch3 humana y los correspondientes epítopos de los mismos. En una realización específica, la reactividad cruzada descrita anteriormente es con respecto a cualquier polipéptido antigénico o inmunogénico específico individual, o una o más combinaciones de los polipéptidos antigénicos y/o inmunogénicos específicos descritos en este documento.

Se incluyen adicionalmente anticuerpos que se unen a polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con un polinucleótido que codifica Notch3 en condiciones rigurosas de hibridación. Los anticuerpos también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido descrito en este documento. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación en equilibrio o K_D de 10^{-8} a 10^{-15} M, 10^{-8} a 10^{-12} M, 10^{-8} a 10^{-10} M, o 10^{-10} a 10^{-12} M. La descripción también proporciona anticuerpos que inhiben de forma competitiva la unión de un anticuerpo a un epítipo de la descripción como se determina por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en este documento. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión al epítipo en al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, o al menos un 50 %.

Vectores y células hospedadoras

En otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias aisladas de ácido nucleico que codifican una variante de anticuerpo como se describe en este documento, construcciones de vector que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención, células hospedadoras que comprenden dicho vector, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante de la variante de anticuerpo, el ácido nucleico codificante se aísla e inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica la variante de anticuerpo se aísla fácilmente y secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de la variante de anticuerpo). Pueden usarse técnicas convencionales para clonación y transformación en la preparación de líneas celulares que expresan los anticuerpos de la presente invención.

Vectores

Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. Los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse usando técnicas bien conocidas. Los vectores de expresión incluyen una secuencia de nucleótidos unida de forma funcional a secuencias de nucleótidos adecuadas reguladoras de la transcripción o la traducción tales como las derivadas de genes de mamífero, microbianos, víricos o de insectos. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores de la transcripción, operadores, potenciadores, sitios de unión ribosómica al ARNm, y u otras secuencias apropiadas que controlan el inicio y la terminación de la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos están "unidas de forma funcional" cuando la secuencia reguladora está relacionada de forma funcional con la secuencia de nucleótidos para el polipéptido apropiado. Por tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida de forma funcional, por ejemplo, a la secuencia de cadena pesada del anticuerpo si la secuencia de nucleótidos del promotor controla la transcripción de la secuencia apropiada de nucleótidos.

Además, pueden incorporarse secuencias que codifican péptidos señal, apropiados que no están asociados de forma natural con las secuencias de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo en los vectores de expresión. Por ejemplo, puede fusionarse una secuencia de nucleótidos para un péptido señal (líder de secreción) en fase con la secuencia polipeptídica de modo que el anticuerpo se secrete al espacio periplásmico o al medio. Un péptido señal que es funcional en las células hospedadoras pretendidas potencia la secreción extracelular del anticuerpo apropiado. El péptido señal puede escindirarse del polipéptido tras la secreción del anticuerpo desde la célula. Ejemplos de dichas señales de secreción con bien conocidos e incluyen, por ejemplo, los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.698.435; 5.698.417; y 6.204.023.

El vector puede ser un vector plasmídico, un vector fágico mono o bicatenario, o un vector vírico de ARN o ADN mono o bicatenario. Dichos vectores pueden introducirse en células como polinucleótidos por técnicas bien conocidas para la introducción de ADN y ARN en células. Los vectores, en el caso de vectores fágicos y víricos también pueden introducirse en células como virus empaquetado o encapsulado por técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores víricos pueden ser competentes en replicación o deficientes en replicación. En el último caso, la propagación del virus generalmente sucederá solamente en células hospedadoras complementarias. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir la proteína usando ARN derivados de las presentes construcciones de ADN. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente de Estados Unidos n.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

Células hospedadoras

Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse a partir de cualquier célula hospedadora adecuada. Ejemplos de células hospedadora útiles en la presente invención incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores incluyen, aunque sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión en levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, *Baculovirus*) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

Los procariotas útiles como células hospedadoras en la presente invención incluyen organismos gram negativos o gram positivos tales como *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*, así como bacilos, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Los vectores de expresión para su uso en células hospedadoras procariotas comprenden generalmente uno o más genes marcadores de selección fenotípica. Un gen marcador de selección fenotípica es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que suministra una necesidad autotrófica. Ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedadoras procariotas incluyen los derivados de plásmidos disponibles en el mercado tales como pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega Biotec,

Madison, Wisconsin, EE.UU.), y pET (Novagen, Madison, Wisconsin, EE.UU) y la serie pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) de vectores (Studier, *J Mol Biol* 219:37 (1991); Schoepfer, *Gene* 124:83 (1993)). Las secuencias promotoras habitualmente usadas para vectores de expresión de células hospedadoras procariotas recombinantes incluyen T7, (Rosenberg, *et al.*, *Gene* 56:125 (1987)), β -lactamasa (penicilinasa), sistema del promotor de lactosa (Chang, *et al.*, *Nature* 275:615 (1978); Goeddel, *et al.*, *Nature* 281:544 (1979)), sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, *et al.*, *Nucl Acids Res* 8:4057 (1980)), y promotor (Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

Las levaduras u hongos filamentosos útiles en la presente invención incluyen aquellos del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Trichoderma*, *Neurospora*, y hongos filamentosos tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyposcladium* y *Aspergillus*. Los vectores de levaduras a menudo contendrán una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levadura 2 μ , una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para la poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y un gen marcador de selección. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levaduras incluyen, entre otros, promotores para la metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman, *et al.*, *J Biol Chem* 255:2073 (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Holland, *et al.*, *Biochem* 17:4900 (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa. Otros vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levaduras se describen adicionalmente en Flier, *et al.*, *Gene* 107:285 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para levaduras y protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos en la técnica. Los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos. Uno de dichos protocolos se describe por Hinnen, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 75:1929 (1978). El protocolo de Hinnen selecciona transformantes *Trp*⁺ en un medio selectivo.

También pueden emplearse sistemas de cultivo de células hospedadoras de mamífero o insecto para expresar anticuerpos recombinantes. En principio, es viable cualquier cultivo de células eucariotas superiores, sea de cultivo vertebrado o invertebrado. Ejemplos de células invertebradas incluyen células vegetales y de insecto (Luckow, *et al.*, *Bio/Technology* 6:47 (1988); Miller, *et al.*, *Genetics Engineering, Setlow, et al.*, ed. Vol. 8, pág. 277-9, Plenum Publishing (1986); Mseda, *et al.*, *Nature* 315:592 (1985)). Por ejemplo, pueden usarse sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insecto, puede usarse el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). Otros hospedadores que se han identificado incluyen *Aedes*, *Drosophila melanogaster*, y *Bombyx mori*. Está disponible al público diversas cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de AcNPV y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como el virus de este documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células *Spodoptera frugiperda*. Además, también pueden utilizarse cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco como hospedadores.

Las células vertebradas, y la propagación de células vertebradas, en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Véase *Tissue Culture*, Kruse, *et al.*, ed., Academic Press (1973). Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son células renales de mono; la línea renal embrionaria humana; células de riñón de cría de hámster; células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4216 (1980)); células de seroitoil de ratón; células de carcinoma cervical humano (HELA); células renales caninas; células pulmonares humanas; células hepáticas humanas; tumor mamario de ratón; y células NS0.

Las células hospedadoras se transforman con los vectores descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional según lo apropiado para inducir promotores, secuencias de control de la transcripción y la traducción, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las secuencias promotoras y secuencias potenciadoras habitualmente usadas se obtienen de poliomavirus, Adenovirus 2, virus de Simio 40 (SV40) y citomegalovirus (CMV) humano. Las secuencias de ADN derivadas del genoma vírico de SV40 pueden usarse para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia génica estructural en una célula hospedadora de mamífero, por ejemplo, el origen de SV40, el promotor temprano y tardío, el potenciador, sitios de corte y empalme y poliadenilación. Los promotores temprano y tardío víricos son particularmente útiles porque se obtienen fácilmente de un genoma vírico como un fragmento que también puede contener un origen vírico de replicación. Vectores de expresión a modo de ejemplo para su uso en células hospedadoras de mamífero están disponibles en el mercado.

Las células hospedadoras usadas para producir la variante de anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en diversos medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma, St Louis, MO), Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma, St Louis, MO), RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO), y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, St Louis, MO) son adecuados para cultivar células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham, *et al.*, *Meth Enzymol* 58:44 (1979), Barnes, *et al.*, *Anal Biochem* 102:255 (1980), y las patentes de Estados Unidos N.º 4.767.704; 4.657.866; 4.560.655; 5.122.469; 5.712.163; o 6.048.728 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según lo

necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruros de X, donde X es sodio, calcio, magnesio; y fosfatos), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN.TM.), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia.

10 Polinucleótidos que codifican anticuerpos

La invención proporciona adicionalmente polinucleótidos o ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención y fragmentos del mismo. Polinucleótidos a modo de ejemplo incluyen aquellos que codifican cadenas de anticuerpo que comprenden una o más de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento. La descripción también abarca polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas o de inferior rigurosidad de hibridación con polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente invención.

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos puede determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier, *et al.*, Bio/Techniques 17:242 (1994)), que, en resumen, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y ligamiento de esos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de un ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contenga un ácido nucleico que codifique un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede sintetizarse químicamente un ácido nucleico que codifique la inmunoglobulina u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A⁺, aislado de, cualquier tejido o células que expresen el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención) por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular a identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR después pueden clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método conocido en la técnica.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo, puede manipularse la secuencia de nucleótidos del anticuerpo usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias nucleotídicas, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); Ausubel, *et al.*, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), que se incorporan ambas por referencia en este documento en su totalidad), para generar anticuerpos que tengan una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácido.

En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera puede inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR por métodos bien conocidos, por ejemplo, por comparación con secuencias conocidas de aminoácidos de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas rutinarias de ADN recombinante, pueden insertarse una o más de las CDR dentro de las regiones flanqueantes, por ejemplo, en regiones flanqueantes humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se describe *supra*. Las regiones flanqueantes pueden ser de origen natural o regiones flanqueantes consenso, y preferiblemente regiones flanqueantes humanas (véase, por ejemplo, Chothia, *et al.*, J Mol Biol 278: 457 (1998) para un listado de las regiones flanqueantes humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones flanqueantes y CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la invención. Preferiblemente, como se analiza *supra*, puede hacerse una o más sustituciones de aminoácido dentro de las regiones flanqueantes y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácido mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, dichos métodos pueden usarse para hacer sustituciones o deleciones de aminoácido de uno o más restos de cisteína en la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Otras alteraciones al polinucleótido están abarcadas por la presente invención y pertenecen a las habilidades de la técnica.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison, *et al.*, Proc Natl Acad Sci 81:851 (1984); Neuberger, *et al.*, Nature 312:604 (1984); Takeda, *et al.*, Nature 314:452 (1985))

por corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se describe *supra*, un anticuerpo quimérico es una molécula en que diferentes partes se obtienen de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un MAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de Estados Unidos N.º 4.946.778; Bird, *Science* 242:423 (1988); Huston, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879 (1988); y Ward, *et al.*, *Nature* 334:544 (1989)) para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de las regiones Fv mediante un puente de aminoácido, produciendo un polipéptido de cadena sencilla. También pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra, *et al.*, *Science* 242:1038 (1988)).

Métodos de producción de anticuerpos anti-Notch3

Los anticuerpos de la invención pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o, preferiblemente, por técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención), requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo. Una vez se ha obtenido el polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante. Se construye un vector de expresión que contiene secuencias codificantes de anticuerpo y señales de control apropiadas de la transcripción y la traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y de recombinación genética *in vivo*.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales y las células transfectadas después se cultivan por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. En un aspecto de la invención, pueden co-expresarse vectores que codifican las cadenas tanto pesada como ligera en la célula hospedadora para la expresión de la molécula completa de inmunoglobulina, como se detalla a continuación.

Puede utilizarse diversos sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención como se ha descrito anteriormente. Dichos sistemas de hospedador-expresión representan vehículos por los cuales pueden producirse las secuencias codificantes de interés y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Células bacterianas tales como *E. coli*, y células eucariotas se usan habitualmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de moléculas completas de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células de mamífero tales como CHO, junto con un vector tal como el elemento promotor génico temprano inmediato principal de citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking, *et al.*, *Gene* 45:101 (1986); Cockett, *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

Además, puede elegirse una cepa de células hospedadoras que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traduccional y la modificación de las proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, aunque sin limitación, células CHO, COS, 293, 3T3, o de mieloma.

Para producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos apropiados de control de la expresión (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN foráneo, se puede permitir que las células modificadas por ingeniería crezcan durante uno o dos días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan hasta formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Ese método puede usarse de forma ventajosa para modificar por ingeniería líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares modificadas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en la detección y evaluación de compuestos que interactúan directa o

indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección incluyendo, aunque sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler, *et al.*, Cell 11:223 (1977)), de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992)), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, *et al.*, Cell 22:817 (1980)) que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 77:357 (1980); O'Hare, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu, *et al.*, Biotherapy 3:87 (1991)); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre, *et al.*, Gene 30:147 (1984)). Los métodos habitualmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse de forma rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel, *et al.*, eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1993); Krieglner, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli, *et al.*, eds, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons (1994); Colberre-Garapin, *et al.*, J Mol Biol 150:1 (1981), que se incorporan por referencia en este documento en sus totalidades.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse por amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington, *et al.*, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells," DNA Cloning, Vol.3. Academic Press (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de células hospedadoras aumentará la cantidad de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada con el gen de anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse, *et al.*, Mol Cell Biol 3:257 (1983)).

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores idénticos de selección que posibilitan una expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un único vector que codifique, y sea capaz de expresar, los polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica ((Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención por un animal, se ha sintetizado químicamente o se ha expresado de forma recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico tras cromatografía con proteína A y de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en este documento o conocidas de otro modo en la técnica, para facilitar la purificación.

La presente invención abarca anticuerpos fusionados de forma recombinante o conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a un polipéptido. Los anticuerpos fusionados o conjugados de la presente invención pueden usarse para facilitar la purificación. Véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 93/21232; el documento EP 439.095; Naramura, *et al.*, Immunol Lett 39:91 (1994); la patente de Estados Unidos n.º 5.474.981; Gillies, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 89:1428 (1992); Fell, *et al.*, J Immunol 146:2446 (1991), que se incorporan por referencia en sus totalidades.

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia marcadora de aminoácidos es un péptido de hexahistidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), entre otras, muchas de las cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas peptídicas útiles para la purificación incluyen, aunque sin limitación, la marca "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson, *et al.*, Cell 37:767 (1984)) y la marca "flag".

60 Purificación de anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, la variante de anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si la variante de anticuerpo se produce de forma intracelular, como primera etapa, pueden retirarse los desechos particulados, células hospedadoras o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter, *et al.*, Bio/Technology 10:163 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta

celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los desechos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando la variante de anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes procedentes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica preferida de purificación. La idoneidad de proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en la variante de anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas de IgG1, IgG2 o IgG4 humana (Lindmark, *et al.*, J Immunol Meth 62:1 (1983)). Se recomienda proteína G para todos los isotipos de ratón y para IgG3 humana (Guss, *et al.*, EMBO J 5:1567 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad muy a menudo es agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado, o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando la variante de anticuerpo comprende un dominio CH3, es útil la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker; Phillipsburg, N.J.) para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE, y precipitación en sulfato amónico, también están disponibles dependiendo de la variante de anticuerpo a recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende la variante de anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizada a bajas concentraciones salinas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

30 **Formulación farmacéutica**

Las formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo pueden prepararse para su almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales "farmacéuticamente aceptables" normalmente empleados en la técnica (todos los cuales se llaman "excipientes"), es decir, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes, y otros aditivos diversos. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, Ed. (1980). Dichos aditivos deben ser no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

Los agentes tamponantes ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Están presentes preferiblemente a una concentración que varía de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato sódico, mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla de ácido tartárico-hidróxido sódico, etc.), tampones fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, etc.) tampones fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico-gluconato potásico, etc.), tampón oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato sódico, mezcla de ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico-oxalato potásico, etc.), tampones lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato sódico, mezcla de ácido láctico-hidróxido sódico, mezcla de ácido láctico-lactato potásico, etc.) y tampones acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico, etc.). Adicionalmente, pueden mencionarse tampones fosfato, tampones histidina y sales trimetilamina tales como Tris.

Pueden añadirse conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y pueden añadirse en cantidades que varían del 0,2 %-1 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de hexametonio, y alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, y 3-pentanol.

Pueden añadirse isotonicantes a veces conocidos como "estabilizantes" para asegurar la isotonicidad de composiciones líquidas de la presente invención e incluir alcoholes de azúcares polihídricos, preferiblemente alcoholes de azúcares trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Estabilizantes se refiere a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función de un agente formador de volumen a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihídrico (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, alfa-monotioglicerol y tiosulfato sódico; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir, <10 restos); proteínas tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, monosacáridos, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 partes por peso del peso de proteína activa.

Pueden añadirse tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica contra agregación inducida por agitación, que también permite que la formulación se exponga a una superficie con tensiones de corte sin causar desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles Pluronic.RTM., monoéteres de polioxietilensorbitán (TWEEN-20®, TWEEN-80®, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Excipientes variados adicionales incluyen agentes de formación de volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y codisolventes. La formulación de este documento también puede contener más de un compuesto activo según lo necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente un agente inmunosupresor. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osal, Ed. (1980).

Las formulaciones a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas estériles de filtración. Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la variante de anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de acetato de etilvinilo, degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D- (-)-3-hidroxi-butírico. Aunque polímeros tales como acetato de etilvinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C provocando una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tiodisulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los restos sulfhidrilo, liofilización en soluciones ácidas, control del contenido de humedad, uso de aditivos apropiados y desarrollo de composiciones de matrices poliméricas específicas.

La cantidad de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Cuando es posible, es deseable determinar la curva de respuesta a dosis y las composiciones farmacéuticas de la invención primero *in vitro*, y después en sistemas útiles de modelo animal antes de su ensayo en seres humanos.

En una realización preferida, se administra una solución acuosa de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo por inyección subcutánea. Cada dosis puede variar de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 50 µg por kilogramo de peso corporal, o más preferiblemente, de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 30 µg por kilogramo de peso corporal.

El programa de dosificación para administración subcutánea puede variar de una vez al mes a diariamente dependiendo de varios factores clínicos, incluyendo el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

5 Usos terapéuticos de anticuerpos anti-Notch3

Se contempla que los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar a un mamífero. En una realización, el anticuerpo se administra a un mamífero no humano con el fin de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Mamíferos no humanos a modo de ejemplo a tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en que se realizan estudios preclínicos. Dichos mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad a tratarse con el anticuerpo o pueden usarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de esas realizaciones, pueden realizarse estudios de aumento de dosis en el mamífero.

Un anticuerpo administrado solo o en combinación con uno o más factores puede usarse como agente terapéutico. La presente invención se refiere al uso médico de los anticuerpos de la invención en terapias basadas en anticuerpo que implican la administración de anticuerpos de la invención a un animal, a un mamífero, o un ser humano, para tratar una enfermedad, trastorno o afección mediada por Notch3. El animal o sujeto puede ser un mamífero que necesita tratamiento particular, tal como un mamífero que se ha diagnosticado con un trastorno particular, por ejemplo, uno relacionado con Notch3. Los anticuerpos dirigidos contra Notch3 son útiles contra enfermedades degenerativas y otras enfermedades asociadas a Notch3 incluyendo CADASIL, FHM, síndrome de Alagille, trastornos neurológicos y degenerativos en mamíferos, incluyendo, aunque sin limitación, vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, primates no humanos, etc., así como seres humanos. Por ejemplo, mediante la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o anticuerpos anti-Notch3, de la presente invención, o un cóctel de los presentes anticuerpos, o en combinación con otros anticuerpos de fuentes variables, pueden mejorarse o prevenirse los síntomas de la enfermedad en el mamífero tratado, particularmente seres humanos.

Los compuestos terapéuticos de la descripción incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos como se describe en este documento) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención como se describe a continuación (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos antiidiotipo, como se describe en este documento). Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con expresión y/o actividad aberrante de Notch3, incluyendo, aunque sin limitación una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas en este documento. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos, o afecciones asociadas con expresión y/o actividad aberrante de Notch3 incluye, aunque sin limitación, alivio de al menos un síntoma asociado con esas enfermedades, trastornos, o afecciones. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables conocidas en la técnica o descritas en este documento.

Los anticuerpos anti-Notch3 de la presente invención pueden usarse terapéuticamente en diversas enfermedades. La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en un método para prevenir o tratar enfermedades mediadas por Notch3 en un mamífero. El método comprende administrar una cantidad de prevención o tratamiento de la enfermedad de anticuerpo anti-Notch3 al mamífero. El anticuerpo anti-Notch3 se une a Notch3 y agoniza su función. La señalización de Notch3 se ha ligado a diversas enfermedades tales como CADASIL, FHM, ataxia paroxística familiar, síndrome de Alagille, y otras enfermedades degenerativas y trastornos neurológicos (Joutel, *et al.*, Nature 383:707 (1996); Flynn, *et al.*, J Pathol 204:55 (2004)). Se especula que anticuerpos anti-Notch3 también serán eficaces para prevenir las enfermedades mencionadas anteriormente.

La cantidad del anticuerpo que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociada con expresión y/o actividad aberrante de Notch3 puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. La dosificación dependerá del tipo de enfermedad a tratarse, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo puede administrarse en regímenes de tratamiento coherentes con la enfermedad, por ejemplo, una única o unas pocas dosis durante uno a varios días para mejorar un estado patológico o dosis periódicas durante un tiempo prolongado para inhibir la progresión de la enfermedad y prevenir la recidiva de la enfermedad. Además, pueden emplearse, opcionalmente, ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis obtenidas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelo animal.

Para anticuerpos, la dosificación administrada a un paciente es normalmente de 0,1 mg/kg a 150 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferiblemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En líneas generales, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga dentro del cuerpo humano que anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos foráneos. Por tanto, a menudo son posibles

dosificaciones inferiores de anticuerpos humanos y administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención pueden reducirse potenciando la captación y penetración tisular (por ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se sostiene hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas convencionales y ensayos.

La composición de variante de anticuerpo se formulará, dosificará y administrará de un modo coherente con la buena práctica médica. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de administración y otros factores conocidos para los facultativos médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" de la variante de anticuerpo ha administrarse estará gobernada por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno. La variante de anticuerpo no tiene que formularse, pero opcionalmente se formula, con uno o más agentes habitualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como las usadas anteriormente en este documento o de aproximadamente el 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos e tratamientos.

En un aspecto preferido, el anticuerpo está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios indeseados).

Se conocen diversos sistemas de suministro y pueden usarse para administrar un anticuerpo de la presente invención, incluyendo inyección, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu, *et al.*, J Biol Chem 262:4429 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc.

El anticuerpo anti-Notch3 puede administrarse al mamífero de cualquier modo aceptable. Los métodos de introducción incluyen, aunque sin limitación, las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, epidural, por inhalación y oral, y si se desea para tratamiento inmunosupresor, administración intrasnal. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos terapéuticos o composiciones de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular o intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión en pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se da por inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente formador de aerosol. El anticuerpo también puede administrarse a los pulmones de un paciente en forma de una composición en polvo seco (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.514.496).

En una realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos terapéuticos o composiciones de forma local al área que necesita tratamiento; esto puede conseguirse por, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, aplicación tópica, por inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, debe tenerse cuidado de usar materiales a los que la proteína no se absorba.

En otra realización, el anticuerpo puede suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, Langer, Science 249:1527 (1990); Treat, *et al.*, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein, *et al.*, ed., pág. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pág. 317-27; véase en líneas generales *ibid.*).

En otra realización más, el anticuerpo puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase, Langer, Science 249:1527 (1990); Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14:201 (1987); Buchwald, *et al.*, Surgery 88:507 (1980); Saudek, *et al.*, N Engl J Med 321:574 (1989)). En otra

realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer, *et al.*, ed., CRC Press (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen, *et al.*, ed., Wiley (1984); Ranger, *et al.*, *J Macromol Sci Rev Macromol Chem* 23:61 (1983); véase también Levy, *et al.*, *Science* 228:190 (1985); During, *et al.*, *Ann Neurol* 25:351 (1989); Howard, *et al.*, *J Neurosurg* 71:105 (1989)). En otra
 5 realización más, puede colocarse un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana terapéutica.

La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una
 cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo y un vehículo fisiológicamente aceptable. En una realización
 10 específica, la expresión "fisiológicamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno
 federal o estatal o enumerado en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida
 para su uso en animales, y particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente,
 adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos fisiológicos
 15 pueden líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o
 sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un
 vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden
 emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente
 para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa,
 20 gelatina, malta, harina de arroz, caliza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro
 sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea,
 también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes
 del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos,
 25 píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse
 como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede
 incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de
 magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos adecuados se describen
 en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad eficaz
 del anticuerpo, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar
 la forma de administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

En una realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición
 30 farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para
 administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición
 también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para eliminar el dolor en el
 sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan juntos en una forma
 35 monodosis, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre en agua en un recipiente sellado
 herméticamente tal como una ampolla o sobrecitos que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición
 tiene que administrarse por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución
 salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse
 una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes
 40 de la administración. La descripción también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más
 recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. Opcionalmente
 asociado con dicho recipiente o recipientes puede haber un aviso en forma prescrita por una agencia gubernamental
 que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, reflejando dicho aviso la
 45 aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración a seres humanos.

Artículos de fabricación

En otra realización de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el
 50 tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una
 etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los
 recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja una
 composición que es eficaz para prevenir o tratar la afección y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el
 recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de
 55 inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es el anticuerpo. La etiqueta sobre, o asociada con el
 recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede
 comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal
 como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, y solución de dextrosa. Puede incluir
 adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros
 60 tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

Terapia génica basada en anticuerpos

En otro aspecto de la descripción, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican
 65 anticuerpos o derivados funcionales de los mismos, para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno
 asociado con expresión y/o actividad aberrante de Notch3, mediante terapia génica. Terapia génica se refiere a
 terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta

realización, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico. Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles puede usarse de acuerdo con la presente invención. Se describen a continuación métodos a modo de ejemplo.

5 Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel, *et al.*, *Clinical Pharmacy* 12:488 (1993); Wu, *et al.*, *Biotherapy* 3:87 (1991); Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32:573 (1993); Mulligan, *Science* 260:926 (1993); Morgan, *et al.*, *Ann Rev Biochem* 62:191 (1993); May, *TIBTECH* 11:155 (1993).

10 En un aspecto, el compuesto comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, siendo parte dichas secuencias de ácido nucleico de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras del mismo en un hospedador adecuado. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico tienen promotores unidos de forma funcional a la región codificante de anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido.

15 En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en que las secuencias codificantes de anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada, están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando por tanto expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8932 (1989); Zijlstra, *et al.*, *Nature* 342:435 (1989)). En realizaciones específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo de cadena sencilla; como alternativa, las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias que codifican ambas cadena pesada y ligera, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo.

25 El suministro de los ácidos nucleicos a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o vectores que portan ácido nucleico, o indirecto, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se trasplantan al paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

30 En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto puede conseguirse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolos de modo que se vuelvan intracelulares, por ejemplo, por infección usando vectores retrovíricos u otros vectores víricos deficientes o atenuados (véase, la patente de Estados Unidos n.º 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolos en unión a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolo en unión a un ligando objeto para endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu, *et al.*, *J Biol Chem* 262:4429 (1987)) (que puede usarse para abordar tipos celulares que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en que el ligando comprende una partícula vírica fusogénica para alterar los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para captación y expresión específica celular, abordando un receptor específico (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188, WO 93/20221). Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse de forma intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para su expresión, por recombinación homóloga ((Koller, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8932 (1989); Zijlstra, *et al.*, *Nature* 342:435 (1989)).

45 En una realización específica, se usan vectores víricos que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, puede usarse un vector retrovírico (véase, Miller, *et al.*, *Meth Enzymol* 217:581 (1993)). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetado del genoma vírico y su integración en el ADN de la célula hospedadora. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo a usarse en terapia génica se clonan en uno o más vectores, que facilitan el suministro del gen a un paciente. Pueden encontrarse más detalles acerca de los vectores retrovíricos en Boesen, *et al.*, *Biotherapy* 6:291 (1994), que describe el uso de un vector retrovírico para suministrar el gen *mdr1* a células madre hematopoyéticas para hacer que las células madre sean más resistentes a quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en terapia génica son: Clowes, *et al.*, *J Clin Invest* 93:644 (1994); Kiem, *et al.*, *Blood* 83:1467 (1994); Salmons, *et al.*, *Human Gene Therapy* 4:129 (1993); y Grossman, *et al.*, *Curr Opin Gen and Dev* 3:110 (1993).

60 También pueden usarse adenovirus en la presente invención. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos en la presente invención para el suministro de anticuerpos al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de forma natural los epitelios respiratorios. Otras dianas para sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células no en división. Kozarsky, *et al.*, *Curr Opin Gen Dev* 3:499 (1993) presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout, *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3 (1994) demostraron el uso de vectores adenovíricos para transferir genes al epitelio respiratorio de macacos de la India. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld, *et al.*, *Science* 252:431 (1991); Rosenfeld, *et al.*, *Cell*

68:143 (1992); Mastrangeli, *et al.*, J Clin Invest 91:225 (1993); publicación PCT WO94/12649; Wang, *et al.*, Gene Therapy 2:775 (1995). También se ha propuesto el virus adenoasociado (AAV) para su uso en terapia génica (Walsh, *et al.*, Proc Soc Exp Biol Med 204:289 (1993); patentes de Estados Unidos n.º 5.436.146; 6.632.670; y 6.642.051).

Otro enfoque para terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección vírica. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Las células después se colocan bajo selección para aislar aquellas células que hayan captado y estén expresando el gen transferido. Esas células después se suministran a un paciente.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión células, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosas técnicas en la técnica para la introducción de genes foráneos en las células (véanse, por ejemplo, Loeffler, *et al.*, Meth Enzymol 217:599 (1993); Cohen, *et al.*, Meth Enzymol 217:618 (1993); Cline, Pharmac Ther 29:69 (1985)) y pueden usarse de acuerdo con la presente invención, con la condición de que no se alteren las funciones necesarias de desarrollo y fisiológicas de las células destinatarias. La técnica debe proporcionar transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferiblemente heredable y expresable por su descendencia celular.

Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un paciente por diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células ideada para su uso depende del efecto deseado, el estado del paciente, etc., y puede determinarse por un experto en la materia.

Las células en que puede introducirse un ácido nucleico con fines de terapia génica abarcan cualquier tipo celular deseado, disponible, e incluyen, aunque sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización, la célula usada para terapia génica es autóloga al paciente. Se introducen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la presente invención en las células de modo que sean expresables por las células o su descendencia, y las células recombinantes después se administran *in vivo* para el efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* puede usarse potencialmente de acuerdo con esta realización de la presente invención (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple, *et al.*, Cell 71:973 (1992); Rheinwald, Meth Cell Bio 21A:229 (1980); Pittelkow, *et al.*, Mayo Clinic Proc 61:771 (1986)).

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de inmunógeno: Proteína de fusión de dominio extracelular de Notch3-Fc

Se generaron anticuerpos monoclonales anti-Notch3 que se unen específicamente al dominio LIN12/de dimerización (a partir de ahora en este documento "LD") de Notch3 humana usando una proteína de fusión Notch3-Fc recombinante como inmunógeno que comprende LD de Notch3 cuyo extremo carboxi terminal se fusionó a una región gamma 1 Fc. Específicamente, el inmunógeno comprendía los restos de aminoácido 1378 a 1640 de LD de Notch3 (véase la Figura 1) y la proteína de fusión γ 1 Fc humana (Notch3 LD/Fc). Se generó un anticuerpo de control usando la región de repetición de EGF de Notch3 del resto de aminoácido 43 a 1377 como inmunógeno.

Se analizó la secuencia proteica de Notch3 usando un software y servicio de búsqueda basado en internet (Motif Search, <http://motif.genome.jp/>). Se usaron ARN hepáticos y pancreáticos humanos (Ambion, Inc. Austin, TX) como moldes para sintetizar la primera hebra de ADNc usando un kit de síntesis de ADNc disponible en el mercado convencional. Los ADNc que codifican el LD de Notch3 y la región de repetición de EGF se amplificaron por PCR en presencia de Betaina (1-2 M) y DMSO (5 %). El fragmento de ADN de Notch3-LD sintetizado por PCR (~0,8 kb) y el fragmento de ADN de Notch3-repetición de EGF (~4 kb) se clonaron en vectores de expresión que comprendían His-y1 Fc en el vector disponible en el mercado pSec o en el vector disponible en el mercado pCD3.1, que albergan cada uno un marcador antibiótico diferente. Esta clonación produjo dos plásmidos de expresión, uno que expresa una proteína de fusión Notch3-LD/Fc y el otro que expresa una proteína de fusión Notch3-EGF/Fc.

Para facilitar la construcción del plásmido y para potenciar la expresión de las diversas proteínas recombinantes Notch3, se generaron oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del péptido líder que comprende los 135

primeros pares de bases de la secuencia codificante del ácido nucleico de Notch3. Estos oligonucleótidos contenían algunos cambios en las posiciones codificantes oscilantes para disminuir el contenido de GC. Todos los cambios de la secuencia de nucleótidos fueron silenciosos, es decir, sin cambios en la secuencia de aminoácidos (Figura 8A y 8B). Después de hibridar los oligonucleótidos juntos, se ligó la secuencia codificante del péptido líder modificado por ingeniería al resto de la secuencia codificante por PCR-SOE (Ho, *et al.*, Gene 77:51 (1989); Horton, *et al.*, BioTechniques 8:528 (1990)) (Véase la Figura 9). Esta secuencia codificante del péptido líder se usó en construcciones de expresión de Notch3-LD/Fc y Notch3. Por lo tanto, ambas proteínas de fusión de Fc comprenden un péptido señal ligado al extremo N-terminal, y una secuencia $\gamma 1$ Fc humana fusionada al extremo C-terminal. La secuencia de aminoácidos de Notch3-LD, incluyendo el péptido líder, se muestra en la Figura 8B y la SEQ ID NO: 6.

Se verificó la expresión de las proteínas de fusión Notch3-EGF/Fc y Notch3-LD/Fc por transfección transitoria de los plásmidos de expresión de Notch3 en células 293T (número de la ATCC CRL-11268, Manassas, VA) y CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectivamente. Antes de la transfección, las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 10 %, 2 mM de glutamina, y solución 1 x de aminoácidos esenciales seguido por siembra de aproximadamente $3-5 \times 10^5$ células por pocillo en placa de 6 pocillos y cultivo durante aproximadamente 24 horas. Se transfectaron tres microgramos de cada uno de los plásmidos de expresión de la proteína de fusión de Notch3 en células en cada pocillo usando un sistema de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Después de la transfección, las células se cultivaron en medio de cultivo fresco y se cultivaron en una incubadora de CO₂ durante aproximadamente 40-48 horas antes de someterlas a análisis de expresión de la proteína de fusión de Notch3. Como alternativa, después de la transfección, las células se cultivaron en medio de cultivo durante 3-4 horas, después se cambiaron a medio DMEM que contenía FCS al 2% y se cultivaron durante aproximadamente 60-66 horas antes de extraer el medio condicionado para el análisis de proteínas secretadas.

Se generaron líneas celulares estables tanto para Notch3-LD/Fc (vector His-Fcy/pSec) como para Notch3-EGF/Fc (vector His-Fcy/pSec). Cada plásmido se transfectó en células CHO. Después de la transfección, las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM durante una noche, después se cambió a medio de cultivo con 800 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina y se cultivaron al menos dos semanas hasta que las células que no portaban el plásmido de expresión de Notch3 se eliminaron por los antibióticos. Los medios condicionados de las líneas celulares estables se sometieron a análisis de transferencia de Western.

Se ensayaron células transfectadas estables o transitorias para la expresión y secreción de la proteína de fusión Notch3-LD/Fc o Notch3-EGF/Fc. Las células transfectadas recogidas de las placas de cultivo se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en agua desionizada, se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga de muestra de proteínas 2 x (BioRad, Hercules, CA) y después se calentaron a aproximadamente 100 °C durante 10 minutos. Se analizó la proteína secretada usando medio condicionado mezclado con un volumen igual de tampón de carga de muestra de proteínas 2 x y se calentó a 100 °C durante 10 minutos. Las muestras se separaron usando SDS-PAGE con gradiente del 4-15 %. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA), que se bloqueó en leche en polvo desnatada al 5 % en PBST (PBS con TWEEN-20® al 0,05 %) durante al menos una hora antes de la transferencia de la proteína.

Se detectaron proteínas de fusión Notch3-EGF/Fc y Notch3-LD/Fc incubando con anticuerpo conjugado con HRP, específico de γFc (Sigma, St Louis, MO) en tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces en PBST y se reveló con un sustrato quimioluminiscente.

Para la purificación de la proteína de fusión de dominio de Notch3/Fc, se cultivaron líneas celulares estables CHO como se ha descrito anteriormente en DMEM con FCS al 2 % durante hasta 5 días. Se recogió un litro de medio condicionado y se sometió a columna compactada con perlas de proteína A para unión de afinidad. La columna se lavó con PBS y se eluyeron las proteínas unidas en tampón citato 50 mM (pH 2,8), y el pH se llevó a neutro añadiendo tampón Tris-HCl 1 M (pH 8). Se evaluó la pureza de la proteína por análisis de gel de proteínas usando SDS-PAGE con gradiente del 4-15 %. Se evaluó la concentración de proteínas usando reactivo de azul de Coomassie siguiendo el protocolo del fabricante ((Pierce, Rockford, IL). A través de este procedimiento, se purificaron cantidades de miligramos de la proteína Notch3-LD/Fc y Notch3-EGF/Fc para inmunización y ensayos de unión ELISA.

Ejemplo 2: Generación de MAbs anti-Notch3

A ratones A/J macho (Harlan, Houston, TX), de 8-12 semanas de edad, se les inyectó por vía subcutánea 25 μg de Notch3-EGF/Fc o Notch3-LD/Fc en adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI) en 200 μl de PBS. Dos semanas después de las inyecciones y tres días antes del sacrificio, a los ratones se les inyectó de nuevo por vía intraperitoneal 25 μg del mismo antígeno en PBS. Para cada fusión, se prepararon suspensiones de células individuales del bazo de un ratón inmunizado y se usaron para la fusión con células de mieloma Sp2/0; se fusionaron 5×10^8 de Sp2/0 y 5×10^8 de células del bazo en un medio que contenía polietilenglicol al 50 % (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, NY) y dimetilsulfóxido al 5 % (Sigma, St. Louis, MO). Las células después se ajustaron hasta una concentración de $1,5 \times 10^5$ células del bazo por 200 μl de la suspensión en medio Iscove (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina,

hipoxantina 0,1 μ M, aminopterina 0,4 μ M, y timidina 16 μ M. Se añadieron doscientos microlitros de la suspensión celular a cada pocillo de aproximadamente sesenta capas de 96 pocillos. Después de aproximadamente 10 días se retiraron los sobrenadantes de cultivo para la exploración de su actividad de unión a anticuerpo usando ELISA.

- 5 Las placas de microensayo Immulon II de fondo plano de 96 pocillos (Dynatech, Laboratories, Chantilly, VA) se recubrieron usando 100 μ l de Notch3-EGF/Fc o Notch3-LD/Fc (0,1 μ g/ml) en (PBS) que contenía Rojo Fenol 1 x y 3-4 gotas de pHix/litro (Pierce, Rockford, IL) y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Después de retirarse la solución de recubrimiento por golpeo de la placa, se añadieron 200 μ l de tampón de bloqueo que contenía BSA al 2 % en PBST que contenía mertiolato al 0,1 % a cada pocillo durante una hora para bloquear la unión no específica. Los pocillos después se lavaron con PBST. Se recogieron cincuenta microlitros de sobrenadante de cultivo de cada pocillo de fusión y se mezclaron con 50 μ l de tampón de bloqueo y después se añadieron a los pocillos individuales de las placas de microtitulación. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavaron con PBST. Después se detectaron los anticuerpos murinos unidos por reacción con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón específico de Fc, conjugados con peroxidasa de rábano rústico (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Se añadió solución de sustrato de HRP que contenía 3,3,5,5-tetrametilbencidina al 0,1 % y peróxido de hidrógeno al 0,0003 % a los pocillos para el desarrollo del color durante 30 minutos. La reacción se terminó mediante la adición de 50 ml de H₂SO₄ 2 M/pocillo. Se leyó la DO a 450 nm con un lector de placa ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).
- 10
- 15
- 20 Entre los 185 hibridomas aislados y analizados, un clon de hibridoma de ratones inmunizados con Notch3-LD/Fc generó un anticuerpo agonista de Notch3 256A-13 y este anticuerpo se caracterizó adicionalmente. Se realizó un ELISA usando el sobrenadante del clon del hibridoma que producía los MAb 256A-13. Los resultados mostraron fuerte actividad de unión a la proteína de fusión Notch3 LD/FC purificada contra la cual se generó y no se unía a Notch1-LD/Fc humana (LIN/dominio de dimerización fusionado a la región Fc en el extremo carboxilo) o una proteína Fc humana de control (datos no mostrados) (Tabla 1).
- 25

Tabla 1. Lecturas de DO de ELISA de 256A-13 usando sobrenadante de hibridoma

Proteína diana	Notch3-LD/Fc	
Sobrenadante del hibridoma	MAb IgG1 de control	256A-13
Media	0,019	2.828
D.T	0,002	0,047

- 30 El clon de hibridoma positivo de esta exploración ELISA principal se aisló adicionalmente por recogida de colonias individuales y se hizo un segundo ensayo ELISA como se ha descrito anteriormente para verificar la unión específica al inmunógeno elegido. El clon de hibridoma confirmado se expandió en cultivos a mayor escala. Los anticuerpos monoclonales (MAb) se purificaron del medio de estos cultivos a gran escala usando una columna de afinidad por proteína A. Los MAb agonistas anti-Notch3 después se caracterizaron usando ensayos de unión basados en células, microscopía, transferencia de Western y análisis FACS.
- 35

Ejemplo 3: Ensayos de unión basados en células para MAb anti-Notch3

- Los ensayos de unión basados en células usados para caracterizar los MAb anti-Notch3 requerían clonación de la longitud completa de una fase de lectura abierta de Notch3 humana en un vector, en este caso pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA). La región codificante de Notch3 se sintetizó por RT-PCR usando ARN de tumor hepático humano (Ambion, Inc., Austin, TX) como molde. La construcción plasmídica final, Notch3/Hygro, expresaba una proteína Notch3 de longitud completa representada en la Figura 1. Se generó una línea celular estable que expresaba Notch3 por transfección de la construcción plasmídica Notch3/Hygro en células 293T (n.º de la ATCC. CRL-11268) usando un kit Lipofectamine 2000 siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 1.
- 40
- 45 Después de la transfección, las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM durante una noche, después se volvieron a sembrar en medio de cultivo con 200 μ g/ml de higromicina y se cultivaron durante 12-14 días. Se picaron colonias individuales bien aisladas y se cultivaron en pocillos diferentes hasta que se amplificaron células clonales suficientes. Se identificaron clones 293T estables que eran resistentes a selección por higromicina y expresaban altos niveles de proteína Notch3 por análisis de transferencia de Western y por electromicroscopía fluorescente usando anticuerpos policlonales anti-Notch3 (R&D Systems, Minneapolis, MN).
- 50

También se construyó un plásmido de expresión de Notch3 parcial que contenía solamente el dominio LIN12/de dimerización (LD) de Notch y el dominio transmembrana (TM) por PCR y se subclonó en pcDNA3.1.

- 55 También se confirmó la línea celular Sup-T1 humana (n.º de la ATCC CRL-1942) que expresaba de forma natural Notch3 por transferencia de Western. Se cultivaron células Sup-T1 en medio RPMI1640 que contenía suero fetal de ternero al 10 %, 2 mM de glutamina y solución 1 x de aminoácidos esenciales.

- 60 Se evaluó la unión del anticuerpo basada en células usando el sistema FMat™ (exploración de alto rendimiento macro-confocal de fluorescencia) 8100 HTS (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo el protocolo

proporcionado por el fabricante. Las líneas celulares que expresaban de forma natural Notch3 o transfectadas de forma estable con construcciones de expresión de Notch3 se sembraron en placas de 96 pocillos. Como alternativa, se sembraron células 293T o CHO transfectadas de forma transitoria en la placa de 96 pocillos. Las células se sembraron a una densidad de 30.000-50.000 células por pocillo. Después de 20-24 horas, se añadieron MAb anti-Notch3 y tampón de reacción de PBS 1 x a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se añadió anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Cy-5 a los pocillos después de retirar los anticuerpos primarios.

También se evaluó la unión de anticuerpos basada en células por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) usando la línea celular estable 293T/Notch3 generada de forma interna y dos líneas de cáncer, las líneas celulares Sup-T1 y A2780 humanas (UK ECACC n.º cat. 93112519), que expresan ambas de forma natural Notch3 (datos no mostrados). Las células primero se incubaron con MAb anti-Notch3 en PBS 1 x. Después de 3 lavados, las células se incubaron con anticuerpo secundario conjugado a una molécula fluorescente. Las células se re-suspendieron, se fijaron en PBS 1 x con paraformaldehído al 0,1 % y se analizaron por FACS (BD Sciences, Palo Alto, CA). Los resultados indicaron que 256A-13 se une al receptor Notch3 expresado a partir de construcciones plasmídicas recombinantes o como una proteína nativa en células cultivadas (Tabla 2). Las células 293T transfectadas de forma transitoria que contenían un plásmido Notch3/Hygro también se tiñeron con inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente y se observaron por microscopia fluorescente.

Tabla 2. Actividad de unión de 256A-13 en análisis FACS basado en células mostrada como intensidad fluorescente media

	IgG1 de control	256A-13
Notch3/Hyg	24,16	32,2
Sup-T1	24,51	55,44

Los análisis FMAT y FACS basados en células confirmaron que los MAb 256A-13 de hecho se unen al receptor Notch3 expresado a partir de construcciones plasmídicas recombinantes o como una proteína nativa en células cultivadas (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de la actividad de unión de MAb anti-Notch3 en FMAT basado en células

Anticuerpo	IgG1 de control	256A-13
Notch3 (longitud completa)	sin unión	unión débil
Notch3-LDTM	sin unión	unión fuerte

Se determinó una señal de unión positiva basada en la lectura de señales FMAT que era significativamente mayor que la de IgG1 de control u otros clones de hibridoma negativos ($p > 0,01$). La lectura de unión de IgG1 de control se consideró el fondo. También se tiñeron células 293T transfectadas de forma transitoria con el plásmido Notch3/Hygro con inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente y se observaron por microscopia fluorescente.

La afinidad de unión de MAb 256A-13 se analizó por el sistema Biacore System (Biacore Inc., Piscataway, NJ). El anticuerpo se inmovilizó directamente sobre un chip a través de acoplamiento amina (nivel de inmovilización: 200 UR), y se inyectó la proteína Notch3-LD/Fc (antígeno) a 5 concentraciones diferentes (que varían de 37,5 a 120 nM con un tiempo de asociación de entre 5-8 minutos y un tiempo de disociación de entre 1 y 2 horas). El tampón de ejecución y el tampón de muestra son PBS que contenían Ca^{2+} 5 mM. La superficie del chip se regeneró con glicina 10 mM, pH 2. El anticuerpo se caracterizó por duplicado. La Tabla 4 describe la media estadística, los errores típicos y constante de disociación cinética (KD) calculada. El anticuerpo tiene una elevada afinidad con una KD de 280 pM, y una lenta tasa de disociación. Tanto los errores típicos como el chi cuadrado son bajos con un buen ajuste (curva dinámica no mostrada).

Tabla 4: Caracterización de afinidad de unión de MAb 256A-13 por Biacore

Muestra	KD [pM]	ka [M ⁻¹ s ⁻¹]	ET (ka)	kd [s ⁻¹]	ET (kd)	χ^2
256A-13	280	4,20 e4	0,98	1,18 e-5	1,02 e-7	0,392

KD: Constante de disociación de 256A-13 y Notch3-LD/Fc. Ka: Tasa de unión de 256A-13 a Notch3-LD/Fc (o tasa de asociación). Kd: Tasa de disociación de 256A-13 de Notch3-LD/Fc (o tasa de disociación). ET: error típico.

Ejemplo 4: Análisis de transferencia de Western de actividad de unión de 256A-13

Se realizó transferencia de Western para evaluar la actividad de unión de 256A-13 al receptor Notch3 en condiciones desnaturizantes, así como los niveles de expresión de Notch3 y otras proteínas relacionadas con Notch en líneas celulares humanas. Se combinó la proteína de fusión Notch3-LD/Fc purificada con el tampón de carga de proteínas. También se prepararon muestras de proteínas a partir de células transfectadas de forma transitoria o estable descritas en el Ejemplo 1, que se recogieron de placas de cultivo, se lavaron una vez con PBS, se re-suspendieron en tampón de extracto proteico celular total (Pierce, Rockford, IL), y se calentaron a 100 °C

durante 10 minutos después de añadir un volumen igual de tampón de carga de muestra de proteínas 2 x. Todas las muestras se separaron por electroforesis en un SDS-PAGE de gradiente del 4-15 %. Las proteínas se transfirieron del gel a membrana de PVDF y se aplicó 256A-13 a la membrana de transferencias de Western como el anticuerpo de detección primario. Se usó un anticuerpo secundario conjugado con HRP para la detección y la señal generada usando un sustrato quimioluminiscente como se ha descrito anteriormente. Se adquirieron anticuerpos de control positivos contra Fc, marca V5, Notch3 y Notch1 humanos de (Invitrogen, R&D Systems, Santa Cruz Biotechnologies, y Orbigen).

El análisis de transferencia de Western mostró que MAb 256A-13 se une a Notch3-LD/Fc en condiciones desnaturizantes, así como una conformación molecular nativa observada en ELISA y análisis FACS.

Ejemplo 5: Evaluación de la funcionalidad de 256A-13 por ensayo indicador de luciferasa

A. Construcciones de plásmidos

Se confirmó la construcción de expresión de Notch3 de longitud completa descrita en el Ejemplo 3 anterior por secuenciación, y es idéntica a la secuencia publicada representada en la Figura 1. La expresión de Notch3 se verificó por transfección transitoria y transferencia de Western como se describe en el Ejemplo 4.

Para generar un plásmido indicador de luciferasa para la señalización de Notch, se sintetizaron dos cebadores oligonucleótidos complementarios que contenían repeticiones en tándem del motivo de unión CBF1 que tienen las siguientes secuencias:

5'GCTCGAGCTCGTGGGAAAATACCGTGGGAAAATGAACCGTGGGAAAATCTCGTGG (SEQ ID NO: 12)

5'GCTCGAGATTTTCCCACGAGATTTTCCCACGGTTC (SEQ ID NO: 13)

Estos dos oligocebadores se hibridaron a 65 °C en 100 mM de NaCl con cada oligo a una concentración de 4 mM. Después de la hibridación entre sí, los cebadores se prolongaron por PCR. El producto de PCR se clonó en un vector disponible en el mercado. El inserto se verificó por secuenciación, que contiene cuatro repeticiones en tándem del motivo de unión CBF1 y dos sitios Xho I flanqueantes. El inserto se escindió usando Xho I y se ligó cadena abajo de la secuencia codificante del indicador de luciferasa de luciérnaga. Después del ensayo indicador de luciferasa y el análisis de secuenciación, se seleccionaron clones plasmídicos con ocho repeticiones de motivos de unión CBF1 y se denominaron CBF1-Luc.

B. Generación de línea celular estable

Se generaron dos líneas celulares estables para ensayos funcionales usando líneas celulares de riñón embrionario humano (HEK293). Una línea celular contenía el plásmido que expresa Notch3 y el plásmido indicador CBF1-Luc integrado en el genoma nuclear. Esta línea celular se generó por co-transfección de los plásmidos Notch3/higromicina y CBF1-Luc en células 293T usando LipoFectamine 2000 de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se seleccionaron clones celulares de transfección estable frente a 200 µg/ml de higromicina en medio de cultivo DMEM, y se exploraron por ensayo indicador de luciferasa y transferencia de Western. Se seleccionó una línea celular con un nivel relativamente alto de expresión del receptor Notch3 (basado en transferencia de Western) y actividad luciferasa para su uso en ensayos funcionales, y se denominó NC85.

C. Ensayo indicador de luciferasa con células que sobreexpresan Notch3 en solitario

Se cultivaron células NC85 en presencia de MAb 256-A13 durante 24 a 48 horas. El medio después se retiró por aspiración, las células se lisaron en tampón de lisis pasiva 1 x (E1501, Promega, Madison, WI) y se ensayaron las actividades luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa siguiendo el protocolo del fabricante (E1501, Promega, Madison, WI) en luminómetro TD-20/20 (Turner Designs Instrument, Sunnyvale, CA). Como se ilustra en la Figura 5, en las células NC85 cultivadas en presencia de MAb 256-A13 la actividad luciferasa se aumentaba casi 4 veces en comparación con la del anticuerpo de control G3. El ensayo indicador de luciferasa demostró que MAb 256-A13 inducía un aumento drástico en la actividad luciferasa sin unión de ligando, mientras que los anticuerpos antagonistas anti-Notch3 MAb 256A-4 y 256A-8 no (Figura 5).

Ejemplo 8: Mapeo del epítipo de unión de 256A-13

A. Estrategia de mapeo de epítipos y fundamento usando construcciones de dominio único y proteína de fusión con Fc de Notch3

Los dominios LIN12/de heterodimerización de Notch3, también llamados dominio LIN12-de dimerización de Notch3 (Notch3-LD) consistían en tres dominios LIN12, 1^{er} LIN12 (L1), 2^o LIN12 (L2) y 3^{er} LIN12 (L3) (véase la Figura 10). Se generaron cinco construcciones de expresión de dominio individual/proteína de fusión con Fc de Notch3 (Figura 7), y se realizó una transferencia de Western para evaluar qué dominio era suficiente para la unión de MAb 256A-13.

Después de la transfección transitoria, los sobrenadantes con dominio individual/proteína de fusión con Fc de Notch3 se analizaron por SDS-PAGE. Los resultados mostraron que MAb 256A-13 solamente se une a Notch3-L1, y no a ningún otro dominio. Los experimentos ELISA también demostraron que MAb 256A-13 tiene unión muy fuerte a Notch3-L1 y unión débil a Notch3-L3, y no a otros dominios (Tabla 5).

5

Tabla 5: resumen de los resultados de transferencia de Western y lecturas ELISA usando MAb 256A-13 contra construcciones de dominio/proteína de fusión con Fc de Notch3

MAb	Resultado de transferencia de Western		Resultado de DO de ELISA	
	256A-13	Anti-Fc humano	256A-13	Anti-Fc humano
Notch3-LD/Fc	Banda positiva	Banda positiva	1,882	1,557
Notch3-L1/Fc	Banda positiva	Banda positiva	1,797	1,364
Notch3-L2/Fc	Sin banda	Banda positiva	0,015	1,337
Notch3-L3/Fc	Sin banda	Banda positiva	1,054	1,425
Notch3-D1/Fc	Sin banda	Banda positiva	0,015	1,608
Notch3-D2/Fc	Sin banda	Banda positiva	0,015	1,628

A. Identificación de uno o más epítomos de unión por intercambio de subdominios

10

En primer lugar, el MAb agonista de Notch3, 256A-13, se une al dominio LIN12/dimerización (LD) de Notch3, pero no al dominio LIN12/dimerización de Notch1 humano homólogo (Tabla 5). En segundo lugar, el MAb anti-Notch3 se une a proteína Notch3 desnaturalizada en transferencia de Western como se analiza en el Ejemplo 4 y 8, lo que indica que 256A-13 se une a un único epítomo o a epítomos concretos independientes entre sí. En tercer lugar, Notch3 y Notch1 comparten aproximadamente un 55 % de homología de secuencia de aminoácidos en el dominio LIN12/dimerización, por lo tanto, se concluyó que un intercambio de subdominios entre Notch3 y Notch1 dentro de esta región no alteraría la conformación proteica. Se amplificó por PCR el ADNc de Notch1-LD usando métodos convencionales de PCR. Se sintetizó el molde de ADNc de primera hebra a partir del ARN total de células PA-1 (ATCC N.º CRL-1572). Se amplificó por PCR la secuencia codificante del péptido líder de cadena kappa de IgG humana, se usó como péptido líder para ligarse al extremo 5' de Notch1-LD por PCR-SOE y se subclonó en His-γ1 Fc/pSec.

15

20

Tabla 6: lecturas de DO de ELISA de MAb 256A-13 e IgG de control que se une a Notch3-LD/Fc o Notch1-LD/Fc

	Notch1-LD/Fc		Notch3-LD/Fc	
	Media	D.T.	Media	D.T.
256A-13	0,094	0,007	4,000	0
IgG1 de control	0,066	0,006	0,063	0,006

25

B. Generación de construcciones de proteína de fusión de intercambio de subdominios

Basándose en los resultados de los análisis ELISA presentados en la Sección A anterior, se dividió adicionalmente el dominio diana del 1^{er} dominio LIN12, o L1 en tres subdominios y se intercambiaron individualmente con el correspondiente subdominio de Notch1-L1. Las construcciones de intercambio de subdominios se generaron usando PCR-SOE (Ho, *et al.*, Gene 77:51 (1989); Horton, *et al.*, BioTechniques 8:528 (1990)) como se ilustra en las Figuras 9 y 10. Se realizaron reacciones de PCR y PCR-SOE usando PCR con Betaina 1 M y DMSO al 5 % añadidos a la reacción. El producto final de PCR-SOE se subclonó y verificó por secuenciación. El clon plasmídico con la secuencia correcta de inserto se escindió con Nhe I y Xho I para escindir el inserto, que se purificó en gel y se subclonó. Las cinco construcciones de intercambio de subdominios de Notch3/Notch1 se ilustran en la Figura 7. Para facilitar el mapeo de epítomos, se usó el péptido de señalización de cadena kappa de IgG humana como péptido líder en las construcciones de intercambio de dominios. Las secuencias de aminoácidos de las construcciones de subdominios se muestran en la Figura 10.

30

35

C. Expresión de proteína de fusión de intercambio de subdominios Notch3/Notch1

40

Los plásmidos de intercambio de dominios de Notch3/Notch1-LD se transfectaron de forma transitoria en células CHO usando LipoFectamine 2000. Se sembraron células CHO en medio de cultivo DMEM con FCS al 10 % a 0,8~1 X 10⁶ células por pocillo en placa de 6 pocillos, mantenidas en incubadora de CO₂ durante una noche antes de la transfección. Las células se recuperaron después de la transfección en el medio de cultivo durante aproximadamente 3 horas, después se cambiaron a DMEM con FCS al 2 %, y se cultivaron durante tres días. Se recogió el medio condicionado y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía la proteína de intercambio de dominio Notch3-LD secretada a partir de CHO se recogió y preparó para transferencia de Western y análisis de unión ELISA. El ELISA mostró que todas las proteínas de fusión de intercambio de dominios se expresaban y secretaban en medio condicionado (Tabla 4), que se confirmó adicionalmente por análisis de transferencia de Western (datos no mostrados).

45

50

Las lecturas de ELISA usaron anticuerpo anti-Fc humano como anticuerpo de detección que muestra que todas las proteínas se expresaban en medio condicionado. Se usó IgG/Fc humano como control. El punto de partida de IgG/Fc humano recubierto en cada pocillo es 100 ng.

5

D. Análisis de unión a epítipo usando ELISA

Las placas de microensayo Immulon II (Dynatech, Laboratories, Chantilly, VA) de fondo plano de 96 pocillos se recubrieron con anticuerpo anti-Fc humano (Jackson ImmunoResearch) añadiendo 100 μ l del anticuerpo (0,1 μ g/ml) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía rojo Fenol 1 x y 3-4 gotas de pHix/litro (Pierce, Rockford, IL), y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Después, se retiró la solución de recubrimiento por golpeteo de la placa, se añadieron 200 μ l de tampón de bloqueo que contenía BSA al 2 % en PBST y mertiolato al 0,1 % a cada pocillo durante 1 hora para bloquear la unión no específica. Los pocillos después se lavaron con PBST. Se recogieron cincuenta microlitros del medio condicionado anterior de cada transfección de construcción de intercambio de dominios Notch3/Notch1, se mezclaron con 50 μ l de tampón de bloqueo y se añadieron a los pocillos individuales de las placas de microtitulación. Después de una hora de incubación, se capturó la proteína de intercambio de dominio Notch3/Notch1-LD por el anticuerpo anti-Fc recubierto, y los pocillos se lavaron con PBST. Se diluyeron en serie MAb anti-Notch3 y MAb de control de isotipo coincidente en tampón de bloqueo como anteriormente, y se añadieron 50 μ l de los MAb diluidos en cada pocillo para evaluar la unión a la proteína de intercambio de dominio Notch3/Notch1 unida. Se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón específico de Fc, conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) para la detección. Se añadió solución de sustrato de HRP que contenía 3,3,5,5-tetrametilbencidina al 0,1 % y peróxido de hidrógeno al 0,0003 % a los pocillos para el desarrollo de color durante 30 minutos. La reacción se terminó mediante la adición de 50 μ l de H₂SO₄ 2 M/pocillo. La DO a 450 nm se leyó con un lector ELISA. Las construcciones de intercambio de subdominios y los grupos de mutaciones se examinaron de forma similar por análisis ELISA anterior.

Los experimentos de unión ELISA usando MAb 256A-13 contra las proteínas de intercambio de subdominios mostraron que el intercambio del 1^{er} subdominio en el dominio L1 de Notch3 (L1) no afectaba a la unión, lo que indica que 256A-13 no se une a esta región. Por otro lado, los intercambios del 2^o y 3^{er} subdominios en Notch3-L1 reducía significativamente la unión. Por lo tanto, esos dos subdominios contienen el epítipo o epítopos de unión para MAb 256A-13. (Figura 10). Por el contrario, el anticuerpo de control negativo de isotipo coincidente, G3, no se une a ninguna de las proteínas de fusión de intercambio de dominios en el ensayo ELISA (Figura 10). Se concluyó a partir de los experimentos anteriores que el 1^{er} dominio LIN12 era necesario para la unión de MAb 256A-13, y específicamente dentro de la 2^a y 3^a región de subdominio.

Para mapear adicionalmente el epítipo específico al que se une MAb 256A-13, se dividieron adicionalmente el 2^o y 3^{er} subdominios del dominio L1 de Notch3 en cinco grupos de aminoácidos, y se intercambiaron con los correspondientes restos de aminoácidos en Notch1 (Figura 10). El ensayo de unión ELISA mostró que el intercambio de DRE (secuencia de Notch3) a SQL (secuencia de Notch1) anulaba completamente la actividad de unión ELISA, lo que indica que solamente este epítipo es necesario para la unión de MAb 256A-13 dentro del dominio Notch3-L1.

Se hace análisis de localización de los restos de aminoácido necesarios para la unión de MAb 256A-13 usando exploración con péptido de di-alanina. Los péptidos de alanina cubren el epítipo de DRE mapeado por análisis de intercambio de aminoácidos. El péptido se sintetiza como una mancha reticulada a membrana de soporte de nailon. Se ensayó la unión de la mancha de transferencia del anticuerpo por transferencia puntual. Se usa MAb G3 como IgG1 de control. Las secuencias peptídicas se presentan en la Figura 11.

Ejemplo 9: Secuenciación de MAb anti-Notch3

Como las propiedades de unión del anticuerpo son completamente dependientes de las regiones variables de tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera, se subtiparon las secuencias variables de 256A-13 y se secuenciaron. Se determinó el subtipo de IgG de anticuerpo usando un kit de anticuerpo monoclonal de ratón Isostrip (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). Los resultados demostraron que 256A-13 tiene una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa.

Las secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera se descodificaron a través de RT-PCR y clonación de ADNc. Se aislaron los ARN totales de los clones de hibridoma 256A-13 usando un kit RNeasy Mini siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen Sciences, Valencia, CA). Se sintetizó el ADNc de primera hebra usando el molde de ARN y el kit Super-scriptase III. Se amplificaron por PCR los ADNc de la región variable de la cadena ligera y cadena pesada a partir del ADNc de primera hebra usando cebadores directos degenerativos que cubren el extremo 5' de la región codificante de la cadena kappa de ratón y un cebador inverso que apareja con la región constante en la unión del extremo 3' de la región variable, o usando cebadores directos degenerativos que cubren el extremo 5' de la región codificante de cadena pesada de ratón y un cebador inverso de la región constante en la cadena pesada de ratón. El producto de PCR se clonó en un vector disponible en el mercado y se secuenció por Lone Star Lab (Houston, TX). Las secuencias de nucleótidos se analizaron utilizando el programa de software informático DNASTar (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Cada secuencia de MAb anti-Notch3 se determinó por

secuencias a partir de múltiples clones de PCR obtenidos del mismo clon de hibridoma.

La región de cadena pesada variable de Mab 256A-13 contiene 121 restos de aminoácido y la región variable de cadena ligera contiene 102 restos de aminoácido (Figura 4A y 4B).

5 Ejemplo 10: Impacto de anticuerpos agonistas de Notch3 sobre la escisión por metaloproteasa de Notch3

La activación del receptor Notch implica escisión por metaloproteasa inducida por ligando en el sitio yuxtamembrana (S2) generando una subunidad extracelular. Esta escisión es un requisito previo esencial para que la escisión S3 libere la región intracelular activada de Notch. Para ensayar si los anticuerpos agonizantes pueden inducir eventos de activación de Notch secuenciales independientes de ligando, incluyendo dos escisiones proteolíticas, se trataron células 293T que expresaban de forma estable un receptor recombinante de Notch3 (células NC85) con G3 o 256-A13. Las subunidades extracelulares solubles generadas por escisión proteolítica en el medio de cultivo se detectaron por un ensayo ELISA usando un anticuerpo unido a una superficie sólida que reconoce el producto de escisión de Notch3. Como se muestra en la Figura 6, el MAb agonista de Notch3 aumentaba significativamente la generación de subunidades extracelulares de Notch3 solubles en el medio condicionado, mientras que el anticuerpo de control G3 no.

Ejemplo 12: Ensayo para enfermedades relacionadas con Notch3

Para identificar otras enfermedades relacionadas con Notch3, se puede secuenciar el gen de Notch3 a partir de muestras de pacientes, o realizar inmunohistoquímica para comprobar la subexpresión del receptor Notch3 usando tejido del paciente. Además, se pueden aislar y cultivar células de un paciente sospechoso de tener una enfermedad asociada con Notch3 y estudiar el impacto de un anticuerpo agonista de la presente invención sobre la señalización de Notch3.

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de averiguar, usando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en este documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

<120> Anticuerpos agonistas anti-Notch3 y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con Notch3

<130> LCW/FP6622930

<140> 07844405.6

<141> 18-10-2007

<150> PCT/US2007/081797

<151> 18-10-2007

<150> 60/879.218

<151> 06-01-2007

<150> 60/852.861

<151> 19-10-2006

<160> 44

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2321

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

Ala Val Cys Phe His Gly Ala Thr Cys His Asp Arg Val Ala Ser Phe
 325 330 335

Tyr Cys Ala Cys Pro Met Gly Lys Thr Gly Leu Leu Cys His Leu Asp
 340 345 350

Asp Ala Cys Val Ser Asn Pro Cys His Glu Asp Ala Ile Cys Asp Thr
 355 360 365

Asn Pro Val Asn Gly Arg Ala Ile Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Thr
 370 375 380

Gly Gly Ala Cys Asp Gln Asp Val Asp Glu Cys Ser Ile Gly Ala Asn
 385 390 395 400

Pro Cys Glu His Leu Gly Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Ser Phe Leu
 405 410 415

Cys Gln Cys Gly Arg Gly Tyr Thr Gly Pro Arg Cys Glu Thr Asp Val
 420 425 430

Asn Glu Cys Leu Ser Gly Pro Cys Arg Asn Gln Ala Thr Cys Leu Asp
 435 440 445

Arg Ile Gly Gln Phe Thr Cys Ile Cys Met Ala Gly Phe Thr Gly Thr
 450 455 460

Tyr Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Gln Ser Ser Pro Cys Val Asn
 465 470 475 480

Gly Gly Val Cys Lys Asp Arg Val Asn Gly Phe Ser Cys Thr Cys Pro
 485 490 495

Ser Gly Phe Ser Gly Ser Thr Cys Gln Leu Asp Val Asp Glu Cys Ala
 500 505 510

Ser Thr Pro Cys Arg Asn Gly Ala Lys Cys Val Asp Gln Pro Asp Gly
 515 520 525

Tyr Glu Cys Arg Cys Ala Glu Gly Phe Glu Gly Thr Leu Cys Asp Arg
 530 535 540

ES 2 585 206 T3

Asn Val Asp Asp Cys Ser Pro Asp Pro Cys His His Gly Arg Cys Val
 545 550 555 560

Asp Gly Ile Ala Ser Phe Ser Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Thr Gly
 565 570 575

Thr Arg Cys Glu Ser Gln Val Asp Glu Cys Arg Ser Gln Pro Cys Arg
 580 585 590

His Gly Gly Lys Cys Leu Asp Leu Val Asp Lys Tyr Leu Cys Arg Cys
 595 600 605

Pro Ser Gly Thr Thr Gly Val Asn Cys Glu Val Asn Ile Asp Asp Cys
 610 615 620

Ala Ser Asn Pro Cys Thr Phe Gly Val Cys Arg Asp Gly Ile Asn Arg
 625 630 635 640

Tyr Asp Cys Val Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Pro Leu Cys Asn Val
 645 650 655

Glu Ile Asn Glu Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gly Glu Gly Gly Ser Cys
 660 665 670

Val Asp Gly Glu Asn Gly Phe Arg Cys Leu Cys Pro Pro Gly Ser Leu
 675 680 685

Pro Pro Leu Cys Leu Pro Pro Ser His Pro Cys Ala His Glu Pro Cys
 690 695 700

Ser His Gly Ile Cys Tyr Asp Ala Pro Gly Gly Phe Arg Cys Val Cys
 705 710 715 720

Glu Pro Gly Trp Ser Gly Pro Arg Cys Ser Gln Ser Leu Ala Arg Asp
 725 730 735

Ala Cys Glu Ser Gln Pro Cys Arg Ala Gly Gly Thr Cys Ser Ser Asp
 740 745 750

Gly Met Gly Phe His Cys Thr Cys Pro Pro Gly Val Gln Gly Arg Gln

ES 2 585 206 T3

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

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

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

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

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

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

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

 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

ES 2 585 206 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Lys Arg Gln Val Leu Ala
 2315 2320

<210> 2

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

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

Thr Ser Val Lys Met Ala Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr
 20 25 30

His Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Thr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Phe Thr Asp Cys Asn Gln Lys
 50 55 60

ES 2 585 206 T3

Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Ala Ser Gly Leu Thr Ala Arg Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
115 120

<210> 3
<211> 102
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 3

Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Thr Ser Asn
1 5 10 15

Tyr Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
20 25 30

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg
35 40 45

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro
50 55 60

Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Phe Tyr Cys Gln His Ser Trp Glu
65 70 75 80

Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ala
85 90 95

Asp Ala Ala Pro Thr Val
100

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 4

ES 2 585 206 T3

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr His Trp Met Asn Trp
1 5 10

5 <210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 5

Ile Asn Pro Ser Asn Asp Phe Thr Asp Cys Asn
1 5 10

15 <210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 6

Thr Ala Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5

25 <210> 7
<211> 15
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
35 <400> 7

Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

40 <210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 8

Tyr Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly
1 5

50 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 585 206 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 9

5 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Ala Lys Arg Gly Asp Gln
1 5 10 15

Arg Cys Asp Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly Cys Gly Trp Asp Gly Gly
20 25 30

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
35

15

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 11

Ala Lys Arg Gly Asp Gln Arg Cys Asp Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly
1 5 10 15

Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
20 25

25

<210> 12

<211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 12

gctcgagctc gtgggaaaat accgtgggaa aatgaaccgt gggaaaatct cgtgg 55

35

<210> 13

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 13

45 gctcgagatt tcccacgag atttccac gggtc 35

<210> 14

<211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 14

Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Ala Lys Arg Gly Asp Gln
 1 5 10 15

Arg Cys Asp Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
 35

10

<210> 15
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

20 <400> 15

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys
 1 5 10 15

Val Cys Ser Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
 35

25

<210> 16
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 16

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Ala Lys Arg Gly Asp Gln
 1 5 10 15

Arg Cys Asp Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn
 35

35

ES 2 585 206 T3

5
 <210> 17
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10
 <400> 17

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asp Gln
 1 5 10 15

Arg Cys Asp Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
 35

15
 <210> 18
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

20
 <400> 18

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Ala Lys Arg Gly Asn Lys
 1 5 10 15

Val Cys Asp Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
 35

25
 <210> 19
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 19

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Ala Lys Arg Gly Asp Gln
 1 5 10 15

Arg Cys Ser Leu Gln Cys Asn Ser Pro Gly Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
 35

ES 2 585 206 T3

5
 <210> 20
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10
 <400> 20

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Ala Lys Arg Gly Asp Gln
 1 5 10 15

Arg Cys Asp Arg Glu Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
 35

15
 <210> 21
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 21

Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln Ala Lys Arg Gly Asp Gln
 1 5 10 15

Arg Cys Asp Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn
 35

25
 <210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 22

Ala Ala Cys Gln Ala Ala Ala Gly Asp Gln Arg Cys
 1 5 10

35
 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 585 206 T3

<400> 23

Ala Cys Gln Ala Lys Ala Ala Asp Gln Arg Cys Asp
1 5 10

5 <210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 24

Cys Gln Ala Lys Arg Ala Ala Gln Arg Cys Asp Arg
1 5 10

15 <210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 25

25 Gln Ala Lys Arg Gly Ala Ala Arg Cys Asp Arg Glu
1 5 10

30 <210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 26

Ala Lys Arg Gly Asp Ala Ala Cys Asp Arg Glu Cys
1 5 10

40 <210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 27

Lys Arg Gly Asp Gln Ala Ala Asp Arg Glu Cys Asn
1 5 10

50 <210> 28
<211> 12
<212> PRT

ES 2 585 206 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 28

Arg Gly Asp Gln Arg Ala Ala Arg Glu Cys Asn Ser
1 5 10

10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 29

Gly Asp Gln Arg Cys Ala Ala Glu Cys Asn Ser Pro
1 5 10

20

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30

<400> 30

Asp Gln Arg Cys Asp Ala Ala Cys Asn Ser Pro Gly
1 5 10

35

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 31

Gln Arg Cys Asp Arg Ala Ala Asn Ser Pro Gly Cys
1 5 10

45

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

55

<400> 32

Arg Cys Asp Arg Glu Ala Ala Ser Pro Gly Cys Gly
1 5 10

ES 2 585 206 T3

5 <210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10 <400> 33

Cys Asp Arg Glu Cys Ala Ala Pro Gly Cys Gly Trp
1 5 10

15 <210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 34

Asp Arg Glu Cys Asn Ala Ala Gly Cys Gly Trp Asp
1 5 10

25 <210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30 <400> 35

Arg Glu Cys Asn Ser Ala Ala Cys Gly Trp Asp Gly
1 5 10

35 <210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40 <400> 36

Glu Cys Asn Ser Pro Ala Ala Gly Trp Asp Gly Gly
1 5 10

45 <210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

50 <400> 37

55 <210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 38

ES 2 585 206 T3

Cys Asn Ser Pro Gly Ala Ala Trp Asp Gly Gly Asp
 1 5 10

5 <210> 38
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Marcador de 6xHis sintética
 <400> 38

His His His His His His
 1 5

15 <210> 39
 <211> 2556
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 39

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

ES 2 585 206 T3

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
 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

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

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 Ala Gly
 850 855 860

Gln Thr Cys Glu Val Asp Ile Asn Glu Cys Val Leu Ser Pro Cys Arg
 865 870 875 880

His Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr His Gly Gly Tyr Arg Cys His Cys
 885 890 895

Gln Ala Gly Tyr Ser Gly Arg Asn Cys Glu Thr Asp Ile Asp Asp Cys
 900 905 910

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

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

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

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

ES 2 585 206 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Val Asp Glu Cys Ser Pro Ser Pro Cys Gln Asn Gly
 1145 1150 1155

Ala Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Tyr Ser Cys Lys Cys Val
 1160 1165 1170

Ala Gly Tyr His Gly Val Asn Cys Ser Glu Glu Ile Asp Glu Cys

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 585 206 T3

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

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

Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly
 1625 1630 1635

Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu
 1640 1645 1650

Leu Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp
 1655 1660 1665

Pro Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn
 1670 1675 1680

Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr
 1685 1690 1695

Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
 1700 1705 1710

Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu
 1715 1720 1725

Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala
 1730 1735 1740

Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser
 1745 1750 1755

Arg Lys Arg Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp Phe Pro Glu Gly
 1760 1765 1770

Phe Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg Arg Glu Pro Leu
 1775 1780 1785

Gly Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp
 1790 1795 1800

ES 2 585 206 T3

Gly Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp Gly Asp Glu Asp
 1805 1810 1815

Leu Glu Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro Val Val Leu Pro
 1820 1825 1830

Asp Leu Asp Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp Thr Gln Gln His
 1835 1840 1845

Leu Asp Ala Ala Asp Leu Arg Met Ser Ala Met Ala Pro Thr Pro
 1850 1855 1860

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Leu Glu

ES 2 585 206 T3

2000	2005	2010
Asp Leu Ile Asn Ser His 2015	Ala 2020	Asp Val Asn Ala Val 2025
Gly Lys Ser Ala Leu His 2030	Trp 2035	Ala Ala Ala Val Asn 2040
Ala Ala Val Val Leu Leu 2045	Lys 2050	Asn Gly Ala Asn Lys 2055
Asn Asn Arg Glu Glu Thr 2060	Pro 2065	Leu Phe Leu Ala Ala 2070
Ser Tyr Glu Thr Ala Lys 2075	Val 2080	Leu Leu Asp His Phe 2085
Asp Ile Thr Asp His Met 2090	Asp 2095	Arg Leu Pro Arg Asp 2100
Glu Arg Met His His Asp 2105	Ile 2110	Val Arg Leu Leu Asp 2115
Leu Val Arg Ser Pro Gln 2120	Leu 2125	His Gly Ala Pro Leu 2130
Pro Thr Leu Ser Pro Pro 2135	Leu 2140	Cys Ser Pro Asn Gly 2145
Ser Leu Lys Pro Gly Val 2150	Gln 2155	Gly Lys Lys Val Arg 2160
Ser Lys Gly Leu Ala Cys 2165	Gly 2170	Ser Lys Glu Ala Lys 2175
Ala Arg Arg Lys Lys Ser 2180	Gln 2185	Asp Gly Lys Gly Cys 2190
Ser Ser Gly Met Leu Ser 2195	Pro 2200	Val Asp Ser Leu Glu 2205

ES 2 585 206 T3

Gly Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser Pro Pro Leu Leu Pro Ser Pro
 2210 2215 2220

Phe Gln Gln Ser Pro Ser Val Pro Leu Asn His Leu Pro Gly Met
 2225 2230 2235

Pro Asp Thr His Leu Gly Ile Gly His Leu Asn Val Ala Ala Lys
 2240 2245 2250

Pro Glu Met Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ala Phe Glu
 2255 2260 2265

Thr Gly Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val Ala Ser Gly Thr
 2270 2275 2280

Ser Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ala Leu Asn Phe Thr
 2285 2290 2295

Val Gly Gly Ser Thr Ser Leu Asn Gly Gln Cys Glu Trp Leu Ser
 2300 2305 2310

Arg Leu Gln Ser Gly Met Val Pro Asn Gln Tyr Asn Pro Leu Arg
 2315 2320 2325

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

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

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

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

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

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

ES 2 585 206 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Lys
 2555

<210> 40
 <211> 2471
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 40

5

Met Pro Ala Leu Arg Pro Ala Leu Leu Trp Ala Leu Leu Ala Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Cys Cys Ala Ala Pro Ala His Ala Leu Gln Cys Arg Asp Gly Tyr
 20 25 30

10

ES 2 585 206 T3

Glu Pro Cys Val Asn Glu Gly Met Cys Val Thr Tyr His Asn Gly Thr
 35 40 45

Gly Tyr Cys Lys Cys Pro Glu Gly Phe Leu Gly Glu Tyr Cys Gln His
 50 55 60

Arg Asp Pro Cys Glu Lys Asn Arg Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Val
 65 70 75 80

Ala Gln Ala Met Leu Gly Lys Ala Thr Cys Arg Cys Ala Ser Gly Phe
 85 90 95

Thr Gly Glu Asp Cys Gln Tyr Ser Thr Ser His Pro Cys Phe Val Ser
 100 105 110

Arg Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys His Met Leu Ser Arg Asp Thr
 115 120 125

Tyr Glu Cys Thr Cys Gln Val Gly Phe Thr Gly Lys Glu Cys Gln Trp
 130 135 140

Thr Asp Ala Cys Leu Ser His Pro Cys Ala Asn Gly Ser Thr Cys Thr
 145 150 155 160

Thr Val Ala Asn Gln Phe Ser Cys Lys Cys Leu Thr Gly Phe Thr Gly
 165 170 175

Gln Lys Cys Glu Thr Asp Val Asn Glu Cys Asp Ile Pro Gly His Cys
 180 185 190

Gln His Gly Gly Thr Cys Leu Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Gln Cys Gln
 195 200 205

Cys Pro Gln Gly Phe Thr Gly Gln Tyr Cys Asp Ser Leu Tyr Val Pro
 210 215 220

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

Asp Phe Thr Phe Glu Cys Asn Cys Leu Pro Gly Phe Glu Gly Ser Thr
 245 250 255

ES 2 585 206 T3

Cys Glu Arg Asn Ile Asp Asp Cys Pro Asn His Arg Cys Gln Asn Gly
 260 265 270

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

Gln Trp Thr Gly Gln Phe Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Leu Leu
 290 295 300

Gln Pro Asn Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ala Asn Arg Asn Gly
 305 310 315 320

Gly Tyr Gly Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Ser Gly Asp Asp Cys Ser
 325 330 335

Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Phe Ala Ser Cys Thr Pro Gly Ser Thr
 340 345 350

Cys Ile Asp Arg Val Ala Ser Phe Ser Cys Met Cys Pro Glu Gly Lys
 355 360 365

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

His Lys Gly Ala Leu Cys Asp Thr Asn Pro Leu Asn Gly Gln Tyr Ile
 385 390 395 400

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

Asp Glu Cys Ala Met Ala Asn Ser Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys
 420 425 430

Cys Val Asn Thr Asp Gly Ala Phe His Cys Glu Cys Leu Lys Gly Tyr
 435 440 445

Ala Gly Pro Arg Cys Glu Met Asp Ile Asn Glu Cys His Ser Asp Pro
 450 455 460

Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Lys Ile Gly Gly Phe Thr Cys
 465 470 475 480

ES 2 585 206 T3

Leu Cys Met Pro Gly Phe Lys Gly Val His Cys Glu Leu Glu Ile Asn
 485 490 495

Glu Cys Gln Ser Asn Pro Cys Val Asn Asn Gly Gln Cys Val Asp Lys
 500 505 510

Val Asn Arg Phe Gln Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Pro Val
 515 520 525

Cys Gln Ile Asp Ile Asp Asp Cys Ser Ser Thr Pro Cys Leu Asn Gly
 530 535 540

Ala Lys Cys Ile Asp His Pro Asn Gly Tyr Glu Cys Gln Cys Ala Thr
 545 550 555 560

Gly Phe Thr Gly Val Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asn Cys Asp Pro
 565 570 575

Asp Pro Cys His His Gly Gln Cys Gln Asp Gly Ile Asp Ser Tyr Thr
 580 585 590

Cys Ile Cys Asn Pro Gly Tyr Met Gly Ala Ile Cys Ser Asp Gln Ile
 595 600 605

Asp Glu Cys Tyr Ser Ser Pro Cys Leu Asn Asp Gly Arg Cys Ile Asp
 610 615 620

Leu Val Asn Gly Tyr Gln Cys Asn Cys Gln Pro Gly Thr Ser Gly Val
 625 630 635 640

Asn Cys Glu Ile Asn Phe Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Ile His
 645 650 655

Gly Ile Cys Met Asp Gly Ile Asn Arg Tyr Ser Cys Val Cys Ser Pro
 660 665 670

Gly Phe Thr Gly Gln Arg Cys Asn Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser
 675 680 685

Asn Pro Cys Arg Lys Gly Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Asn Gly Phe

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

Asp Asp Cys Leu Ala Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Met Asp
 915 920 925

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

Lys Cys Gln Thr Asp Met Asn Glu Cys Leu Ser Glu Pro Cys Lys Asn
 945 950 955 960

Gly Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Val Asn Ser Tyr Thr Cys Lys Cys Gln
 965 970 975

Ala Gly Phe Asp Gly Val His Cys Glu Asn Asn Ile Asn Glu Cys Thr
 980 985 990

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

Phe Ser Cys Leu Cys Pro Val Gly Phe Thr Gly Ser Phe Cys Leu
 1010 1015 1020

His Glu Ile Asn Glu Cys Ser Ser His Pro Cys Leu Asn Glu Gly
 1025 1030 1035

Thr Cys Val Asp Gly Leu Gly Thr Tyr Arg Cys Ser Cys Pro Leu
 1040 1045 1050

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

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

Glu Ser Gln Cys Leu Cys Pro Ser Gly Trp Ala Gly Ala Tyr Cys
 1085 1090 1095

Asp Val Pro Asn Val Ser Cys Asp Ile Ala Ala Ser Arg Arg Gly
 1100 1105 1110

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

ES 2 585 206 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gln Met Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ala Val Ala Ser
 1310 1315 1320

Asn Met Pro Asp Gly Phe Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe Ser
 1325 1330 1335

ES 2 585 206 T3

Gly Ala Arg Cys Gln Ser Ser Cys Gly Gln Val Lys Cys Arg Lys
 1340 1345 1350

Gly Glu Gln Cys Val His Thr Ala Ser Gly Pro Arg Cys Phe Cys
 1355 1360 1365

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

Gln His Gly Gly Ser Cys His Pro Gln Arg Gln Pro Pro Tyr Tyr
 1385 1390 1395

Ser Cys Gln Cys Ala Pro Pro Phe Ser Gly Ser Arg Cys Glu Leu
 1400 1405 1410

Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Thr Pro Pro Ala Thr Cys Leu Ser Gln
 1415 1420 1425

Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly Val Cys Asp Glu Ala Cys
 1430 1435 1440

Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Thr
 1445 1450 1455

Met Glu Asn Pro Trp Ala Asn Cys Ser Ser Pro Leu Pro Cys Trp
 1460 1465 1470

Asp Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Leu Cys Asn Thr Val Glu
 1475 1480 1485

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

Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His Cys
 1505 1510 1515

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp
 1520 1525 1530

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

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

Val Ser Glu Ala Asn Leu Ile Gly Thr Gly Thr Ser Glu His Trp
 1745 1750 1755

Val Asp Asp Glu Gly Pro Gln Pro Lys Lys Val Lys Ala Glu Asp
 1760 1765 1770

Glu Ala Leu Leu Ser Glu Glu Asp Asp Pro Ile Asp Arg Arg Pro
 1775 1780 1785

Trp Thr Gln Gln His Leu Glu Ala Ala Asp Ile Arg Arg Thr Pro
 1790 1795 1800

Ser Leu Ala Leu Thr Pro Pro Gln Ala Glu Gln Glu Val Asp Val
 1805 1810 1815

Leu Asp Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Cys Thr Pro Leu Met
 1820 1825 1830

Leu Ala Ser Leu Arg Gly Gly Ser Ser Asp Leu Ser Asp Glu Asp
 1835 1840 1845

Glu Asp Ala Glu Asp Ser Ser Ala Asn Ile Ile Thr Asp Leu Val
 1850 1855 1860

Tyr Gln Gly Ala Ser Leu Gln Ala Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu
 1865 1870 1875

Met Ala Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ala Asp Ala Ala
 1880 1885 1890

Lys Arg Leu Leu Asp Ala Gly Ala Asp Ala Asn Ala Gln Asp Asn
 1895 1900 1905

Met Gly Arg Cys Pro Leu His Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Gln
 1910 1915 1920

Gly Val Phe Gln Ile Leu Ile Arg Asn Arg Val Thr Asp Leu Asp
 1925 1930 1935

Ala Arg Met Asn Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg
 1940 1945 1950

ES 2 585 206 T3

Leu Ala Val Glu Gly Met Val Ala Glu Leu Ile Asn Cys Gln Ala
 1955 1960 1965

Asp Val Asn Ala Val Asp Asp His Gly Lys Ser Ala Leu His Trp
 1970 1975 1980

Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Glu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Lys
 1985 1990 1995

Asn Gly Ala Asn Arg Asp Met Gln Asp Asn Lys Glu Glu Thr Pro
 2000 2005 2010

Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu Ala Ala Lys Ile
 2015 2020 2025

Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His Met Asp
 2030 2035 2040

Arg Leu Pro Arg Asp Val Ala Arg Asp Arg Met His His Asp Ile
 2045 2050 2055

Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Val Thr Pro Ser Pro Pro Gly
 2060 2065 2070

Thr Val Leu Thr Ser Ala Leu Ser Pro Val Ile Cys Gly Pro Asn
 2075 2080 2085

Arg Ser Phe Leu Ser Leu Lys His Thr Pro Met Gly Lys Lys Ser
 2090 2095 2100

Arg Arg Pro Ser Ala Lys Ser Thr Met Pro Thr Ser Leu Pro Asn
 2105 2110 2115

Leu Ala Lys Glu Ala Lys Asp Ala Lys Gly Ser Arg Arg Lys Lys
 2120 2125 2130

Ser Leu Ser Glu Lys Val Gln Leu Ser Glu Ser Ser Val Thr Leu
 2135 2140 2145

Ser Pro Val Asp Ser Leu Glu Ser Pro His Thr Tyr Val Ser Asp
 2150 2155 2160

ES 2 585 206 T3

Thr Thr Ser Ser Pro Met Ile Thr Ser Pro Gly Ile Leu Gln Ala
 2165 2170 2175

Ser Pro Asn Pro Met Leu Ala Thr Ala Ala Pro Pro Ala Pro Val
 2180 2185 2190

His Ala Gln His Ala Leu Ser Phe Ser Asn Leu His Glu Met Gln
 2195 2200 2205

Pro Leu Ala His Gly Ala Ser Thr Val Leu Pro Ser Val Ser Gln
 2210 2215 2220

Leu Leu Ser His His His Ile Val Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ala
 2225 2230 2235

Gly Ser Leu Ser Arg Leu His Pro Val Pro Val Pro Ala Asp Trp
 2240 2245 2250

Met Asn Arg Met Glu Val Asn Glu Thr Gln Tyr Asn Glu Met Phe
 2255 2260 2265

Gly Met Val Leu Ala Pro Ala Glu Gly Thr His Pro Gly Ile Ala
 2270 2275 2280

Pro Gln Ser Arg Pro Pro Glu Gly Lys His Ile Thr Thr Pro Arg
 2285 2290 2295

Glu Pro Leu Pro Pro Ile Val Thr Phe Gln Leu Ile Pro Lys Gly
 2300 2305 2310

Ser Ile Ala Gln Pro Ala Gly Ala Pro Gln Pro Gln Ser Thr Cys
 2315 2320 2325

Pro Pro Ala Val Ala Gly Pro Leu Pro Thr Met Tyr Gln Ile Pro
 2330 2335 2340

Glu Met Ala Arg Leu Pro Ser Val Ala Phe Pro Thr Ala Met Met
 2345 2350 2355

Pro Gln Gln Asp Gly Gln Val Ala Gln Thr Ile Leu Pro Ala Tyr

ES 2 585 206 T3

2360 2365 2370

His Pro Phe Pro Ala Ser Val Gly Lys Tyr Pro Thr Pro Pro Ser
 2375 2380 2385

Gln His Ser Tyr Ala Ser Ser Asn Ala Ala Glu Arg Thr Pro Ser
 2390 2395 2400

His Ser Gly His Leu Gln Gly Glu His Pro Tyr Leu Thr Pro Ser
 2405 2410 2415

Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser Ser Pro His Ser Ala
 2420 2425 2430

Ser Asp Trp Ser Asp Val Thr Thr Ser Pro Thr Pro Gly Gly Ala
 2435 2440 2445

Gly Gly Gly Gln Arg Gly Pro Gly Thr His Met Ser Glu Pro Pro
 2450 2455 2460

His Asn Asn Met Gln Val Tyr Ala
 2465 2470

<210> 41
 <211> 2002
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 41

Met Gln Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Val Ser Val Val Arg Pro Arg Gly Leu Leu Cys Gly Ser Phe Pro Glu
 20 25 30

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

Thr Cys Gln Cys Ala Pro Gly Phe Leu Gly Glu Thr Cys Gln Phe Pro
 50 55 60

Asp Pro Cys Gln Asn Ala Gln Leu Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Gln
 65 70 75 80

10

ES 2 585 206 T3

Ala Leu Leu Pro Ala Pro Leu Gly Leu Pro Ser Ser Pro Ser Pro Leu
85 90 95

Thr Pro Ser Phe Leu Cys Thr Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Glu Arg
100 105 110

Cys Gln Ala Lys Leu Glu Asp Pro Cys Pro Pro Ser Phe Cys Ser Lys
115 120 125

Arg Gly Arg Cys His Ile Gln Ala Ser Gly Arg Pro Gln Cys Ser Cys
130 135 140

Met Pro Gly Trp Thr Gly Glu Gln Cys Gln Leu Arg Asp Phe Cys Ser
145 150 155 160

Ala Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Leu Ala Thr Tyr Pro Gln
165 170 175

Ile Gln Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Glu Gly His Ala Cys Glu Arg
180 185 190

Asp Val Asn Glu Cys Phe Gln Asp Pro Gly Pro Cys Pro Lys Gly Thr
195 200 205

Ser Cys His Asn Thr Leu Gly Ser Phe Gln Cys Leu Cys Pro Val Gly
210 215 220

Gln Glu Gly Pro Arg Cys Glu Leu Arg Ala Gly Pro Cys Pro Pro Arg
225 230 235 240

Gly Cys Ser Asn Gly Gly Thr Cys Gln Leu Met Pro Glu Lys Asp Ser
245 250 255

Thr Phe His Leu Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Ile Gly Pro Gly Cys
260 265 270

Glu Val Asn Pro Asp Asn Cys Val Ser His Gln Cys Gln Asn Gly Gly
275 280 285

Thr Cys Gln Asp Gly Leu Asp Thr Tyr Thr Cys Leu Cys Pro Glu Thr

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

Thr Asn Glu Cys Ala Ser Ala Pro Cys Leu Asn His Ala Asp Cys His
 515 520 525

Asp Leu Leu Asn Gly Phe Gln Cys Ile Cys Leu Pro Gly Phe Ser Gly
 530 535 540

Thr Arg Cys Glu Glu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Ser Ser Pro Cys Ala
 545 550 555 560

Asn Gly Gly Gln Cys Gln Asp Gln Pro Gly Ala Phe His Cys Lys Cys
 565 570 575

Leu Pro Gly Phe Glu Gly Pro Arg Cys Gln Thr Glu Val Asp Glu Cys
 580 585 590

Leu Ser Asp Pro Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys Leu Asp Leu Pro Gly
 595 600 605

Ala Phe Phe Cys Leu Cys Pro Ser Gly Phe Thr Gly Gln Leu Cys Glu
 610 615 620

Val Pro Leu Cys Ala Pro Asn Leu Cys Gln Pro Lys Gln Ile Cys Lys
 625 630 635 640

Asp Gln Lys Asp Lys Ala Asn Cys Leu Cys Pro Asp Gly Ser Pro Gly
 645 650 655

Cys Ala Pro Pro Glu Asp Asn Cys Thr Cys His His Gly His Cys Gln
 660 665 670

Arg Ser Ser Cys Val Cys Asp Val Gly Trp Thr Gly Pro Glu Cys Glu
 675 680 685

Ala Glu Leu Gly Gly Cys Ile Ser Ala Pro Cys Ala His Gly Gly Thr
 690 695 700

Cys Tyr Pro Gln Pro Ser Gly Tyr Asn Cys Thr Cys Pro Thr Gly Tyr
 705 710 715 720

Thr Gly Pro Thr Cys Ser Glu Glu Met Thr Ala Cys His Ser Gly Pro
 725 730 735

ES 2 585 206 T3

Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Asn Pro Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Cys
 740 745 750

Thr Cys Pro Pro Ser His Thr Gly Pro Gln Cys Gln Thr Ser Thr Asp
 755 760 765

Tyr Cys Val Ser Ala Pro Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asn Arg
 770 775 780

Pro Gly Thr Phe Ser Cys Leu Cys Ala Met Gly Phe Gln Gly Pro Arg
 785 790 795 800

Cys Glu Gly Lys Leu Arg Pro Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Arg Asn
 805 810 815

Arg Ala Thr Cys Gln Asp Ser Pro Gln Gly Pro Arg Cys Leu Cys Pro
 820 825 830

Thr Gly Tyr Thr Gly Gly Ser Cys Gln Thr Leu Met Asp Leu Cys Ala
 835 840 845

Gln Lys Pro Cys Pro Arg Asn Ser His Cys Leu Gln Thr Gly Pro Ser
 850 855 860

Phe His Cys Leu Cys Leu Gln Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Asn Leu
 865 870 875 880

Pro Leu Ser Ser Cys Gln Lys Ala Ala Leu Ser Gln Gly Ile Asp Val
 885 890 895

Ser Ser Leu Cys His Asn Gly Gly Leu Cys Val Asp Ser Gly Pro Ser
 900 905 910

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

His Val Asn Pro Cys Glu Ser Arg Pro Cys Gln Asn Gly Ala Thr Cys
 930 935 940

Met Ala Gln Pro Ser Gly Tyr Leu Cys Gln Cys Ala Pro Gly Tyr Asp
 945 950 955 960

ES 2 585 206 T3

Gly Gln Asn Cys Ser Lys Glu Leu Asp Ala Cys Gln Ser Gln Pro Cys
 965 970 975

His Asn His Gly Thr Cys Thr Pro Lys Pro Gly Gly Phe His Cys Ala
 980 985 990

Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Leu Arg Cys Glu Gly Asp Val Asp Glu
 995 1000 1005

Cys Leu Asp Gln Pro Cys His Pro Thr Gly Thr Ala Ala Cys His
 1010 1015 1020

Ser Leu Ala Asn Ala Phe Tyr Cys Gln Cys Leu Pro Gly His Thr
 1025 1030 1035

Gly Gln Trp Cys Glu Val Glu Ile Asp Pro Cys His Ser Gln Pro
 1040 1045 1050

Cys Phe His Gly Gly Thr Cys Glu Ala Thr Ala Gly Ser Pro Leu
 1055 1060 1065

Gly Phe Ile Cys His Cys Pro Lys Gly Phe Glu Gly Pro Thr Cys
 1070 1075 1080

Ser His Arg Ala Pro Ser Cys Gly Phe His His Cys His His Gly
 1085 1090 1095

Gly Leu Cys Leu Pro Ser Pro Lys Pro Gly Phe Pro Pro Arg Cys
 1100 1105 1110

Ala Cys Leu Ser Gly Tyr Gly Gly Pro Asp Cys Leu Thr Pro Pro
 1115 1120 1125

Ala Pro Lys Gly Cys Gly Pro Pro Ser Pro Cys Leu Tyr Asn Gly
 1130 1135 1140

Ser Cys Ser Glu Thr Thr Gly Leu Gly Gly Pro Gly Phe Arg Cys
 1145 1150 1155

Ser Cys Pro His Ser Ser Pro Gly Pro Arg Cys Gln Lys Pro Gly

ES 2 585 206 T3

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

ES 2 585 206 T3

Leu Gly Lys Glu Thr Asp Ser Leu Ser Ala Gly Phe Val Val Val
 1370 1375 1380

Met Gly Val Asp Leu Ser Arg Cys Gly Pro Asp His Pro Ala Ser
 1385 1390 1395

Arg Cys Pro Trp Asp Pro Gly Leu Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ala
 1400 1405 1410

Met Ala Ala Val Gly Ala Leu Glu Pro Leu Leu Pro Gly Pro Leu
 1415 1420 1425

Leu Ala Val His Pro His Ala Gly Thr Ala Pro Pro Ala Asn Gln
 1430 1435 1440

Leu Pro Trp Pro Val Leu Cys Ser Pro Val Ala Gly Val Ile Leu
 1445 1450 1455

Leu Ala Leu Gly Ala Leu Leu Val Leu Gln Leu Ile Arg Arg Arg
 1460 1465 1470

Arg Arg Glu His Gly Ala Leu Trp Leu Pro Pro Gly Phe Thr Arg
 1475 1480 1485

Arg Pro Arg Thr Gln Ser Ala Pro His Arg Arg Arg Pro Pro Leu
 1490 1495 1500

Gly Glu Asp Ser Ile Gly Leu Lys Ala Leu Lys Pro Lys Ala Glu
 1505 1510 1515

Val Asp Glu Asp Gly Val Val Met Cys Ser Gly Pro Glu Glu Gly
 1520 1525 1530

Glu Glu Val Gly Gln Ala Glu Glu Thr Gly Pro Pro Ser Thr Cys
 1535 1540 1545

Gln Leu Trp Ser Leu Ser Gly Gly Cys Gly Ala Leu Pro Gln Ala
 1550 1555 1560

Ala Met Leu Thr Pro Pro Gln Glu Ser Glu Met Glu Ala Pro Asp
 1565 1570 1575

ES 2 585 206 T3

Leu Asp Thr Arg Gly Pro Asp Gly Val Thr Pro Leu Met Ser Ala
 1580 1585 1590

Val Cys Cys Gly Glu Val Gln Ser Gly Thr Phe Gln Gly Ala Trp
 1595 1600 1605

Leu Gly Cys Pro Glu Pro Trp Glu Pro Leu Leu Asp Gly Gly Ala
 1610 1615 1620

Cys Pro Gln Ala His Thr Val Gly Thr Gly Glu Thr Pro Leu His
 1625 1630 1635

Leu Ala Ala Arg Phe Ser Arg Pro Thr Ala Ala Arg Arg Leu Leu
 1640 1645 1650

Glu Ala Gly Ala Asn Pro Asn Gln Pro Asp Arg Ala Gly Arg Thr
 1655 1660 1665

Pro Leu His Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Arg Glu Val Cys Gln
 1670 1675 1680

Leu Leu Leu Arg Ser Arg Gln Thr Ala Val Asp Ala Arg Thr Glu
 1685 1690 1695

Asp Gly Thr Thr Pro Leu Met Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu
 1700 1705 1710

Asp Leu Val Glu Glu Leu Ile Ala Ala Gln Ala Asp Val Gly Ala
 1715 1720 1725

Arg Asp Lys Trp Gly Lys Thr Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val
 1730 1735 1740

Asn Asn Ala Arg Ala Ala Arg Ser Leu Leu Gln Ala Gly Ala Asp
 1745 1750 1755

Lys Asp Ala Gln Asp Asn Arg Glu Gln Thr Pro Leu Phe Leu Ala
 1760 1765 1770

Ala Arg Glu Gly Ala Val Glu Val Ala Gln Leu Leu Leu Gly Leu
 1775 1780 1785

ES 2 585 206 T3

Gly Ala Ala Arg Glu Leu Arg Asp Gln Ala Gly Leu Ala Pro Ala
 1790 1795 1800

Asp Val Ala His Gln Arg Asn His Trp Asp Leu Leu Thr Leu Leu
 1805 1810 1815

Glu Gly Ala Gly Pro Pro Glu Ala Arg His Lys Ala Thr Pro Gly
 1820 1825 1830

Arg Glu Ala Gly Pro Phe Pro Arg Ala Arg Thr Val Ser Val Ser
 1835 1840 1845

Val Pro Pro His Gly Gly Gly Ala Leu Pro Arg Cys Arg Thr Leu
 1850 1855 1860

Ser Ala Gly Ala Gly Pro Arg Gly Gly Gly Ala Cys Leu Gln Ala
 1865 1870 1875

Arg Thr Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Arg Gly Gly Gly Ala Tyr
 1880 1885 1890

Ser His Cys Arg Ser Leu Ser Gly Val Gly Ala Gly Gly Gly Pro
 1895 1900 1905

Thr Pro Arg Gly Arg Arg Phe Ser Ala Gly Met Arg Gly Pro Arg
 1910 1915 1920

Pro Asn Pro Ala Ile Met Arg Gly Arg Tyr Gly Val Ala Ala Gly
 1925 1930 1935

Arg Gly Gly Arg Val Ser Thr Asp Asp Trp Pro Cys Asp Trp Val
 1940 1945 1950

Ala Leu Gly Ala Cys Gly Ser Ala Ser Asn Ile Pro Ile Pro Pro
 1955 1960 1965

Pro Cys Leu Thr Pro Ser Pro Glu Arg Gly Ser Pro Gln Leu Asp
 1970 1975 1980

Cys Gly Pro Pro Ala Leu Gln Glu Met Pro Ile Asn Gln Gly Gly
 1985 1990 1995

Glu Gly Lys Lys
 2000

ES 2 585 206 T3

5
 <210> 42
 <211> 135
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10
 <400> 42

```

atgggtccag gtgcaagagg tagaaggcgt agaaggagac caatgagccc acctcctccg      60
ccacctccag tgagagcact gcctttgctg ttgctgctgg ctggacctgg tgcagcagct      120
cctccttgcc tggac                                                         135
  
```

15
 <210> 43
 <211> 135
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 43

```

atggggccgg gggcccgtgg ccgccgcgcg cgccgtcgcc cgatgtcgcc gccaccgcca      60
ccgccaccgg tgcgggcgct gccctgctg ctgctgctag cggggccggg ggcctgcagcc      120
cccccttgcc tggac                                                         135
  
```

20
 <210> 44
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

30
 <400> 44

```

Met Gly Pro Gly Ala Arg Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Met Ser
 1           5           10           15

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Arg Ala Leu Pro Leu Leu Leu Leu
          20           25           30

Leu Ala Gly Pro Gly Ala Ala Ala Pro Pro Cys Leu Asp
          35           40           45
  
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente al receptor Notch 3, en donde el anticuerpo se une específicamente a un epítipo en la SEQ ID NO: 10, y en donde el anticuerpo es un agonista de Notch 3 que activa la señalización mediada por el receptor Notch 3 a través del receptor Notch 3 independiente de una unión de ligando al receptor Notch 3.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une específicamente a un epítipo en la SEQ ID NO: 11.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR-H1 de la SEQ ID NO: 4, CDR-H2 de la SEQ ID NO: 5 y CDR-H3 de la SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR-L1 de la SEQ ID NO: 7, CDR-L2 de la SEQ ID NO: 8 y CDR-L3 de la SEQ ID NO: 9.
- 20 4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que la región de cadena VH comprende la SEQ ID NO: 2 y la región de cadena VL comprende la SEQ ID NO: 3.
- 25 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo tiene una afinidad de unión (Kd) de 10^{-8} a 10^{-10} M.
- 30 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 35 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
- 40 8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno.
- 45 9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un Fv de cadena sencilla.
- 50 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un marcador.
- 55 11. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
12. El ácido nucleico de la reivindicación 11, que codifica una o más de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9.
13. Un vector que comprende el ácido nucleico de las reivindicaciones 11 o 12.
14. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 13.
15. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula de la reivindicación 14 en condiciones apropiadas para la producción de un anticuerpo y aislar el anticuerpo producido.
16. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un método de tratamiento.
17. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionados con Notch 3.
18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa.
19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la enfermedad es CADASIL, migraña hemipléjica familiar (FHM), ataxia paroxística familiar o síndrome de Alagille.

FIGURA 1

Secuencia de aminoácidos de Notch 3 humana (NP_000426)

1 MGPARGRRR RRRPMSPPPP PPPVRAIPLL LLLAGPGAAA PPCLDGSPCA NGGRCTQLPS
 61 REAACLCPPG WVGERCQLED PCHSGPCAGR GVCQSSVVAG TARFSCRCPR GFRGPDCLSP
 121 DPCLSSPCAH GARCSVGPDG RFLCSCPPGY QGRSCRSDVD ECRVGEPCRH GGTCCLNTPGS
 181 FRCQCPAGYT GPLCENPAVP CAPSPCRNGG TCRQSGDLTY DCACLPGFEG QNCEVNVDDC
 241 PGHRCLNGGT CVDGVNTYNC QCPPEWTGQF CTEDVDECQL QPNACHNGGT CFNTLLGGHSC
 301 VCVNGWTGES CSQNIDDCAT AVCFHGATCH DRVASFYCAC PMGKTGLLCH LDDACVSNPC
 361 HEDAICDTNP VNGRAICTCP PGFTGGACDQ DVDECSIGAN PCEHLGRCVN TQGSFLLCQG
 421 RGYTGPRCET DVNECLSGPC RNQATCLDRI GQFTICMAG FTGTyceVDI DECQSSPCVN
 481 GGCKDRVNG FSCTCPSGFS GSTCQLDVDE CASTPCRNGA KCVDQPDGYE CRCAEGFEGT
 541 LCDRNVDACS PDPCHHGRCV DGLASFSCAC APGYTGTRCE SQVDECRSQP CRHGGKCLDL
 601 VDKYLCRCPS GTTGVNCEVN IDDCASNPT FGVCRDGINR YDCVCQPGFT GPLCNVEINE
 661 CASSPCGEGG SCVDGENGFR CLCPPGSLPP LCLPPSHPCA HEPCSHGICY DAPGGFRVCV
 721 EPGWSGPRCS QSLARDACES QPCRAGGTCS SDGMGFHCTC PPGVQGRQCE LLSPCTPNPC
 781 EHGGRCESAP GQLPVCSCPQ GWQGPCRQDQ VDECAQAPC GPHGICTNLA GSFSCCTHGG
 841 YTGPCDQDI NDCDPNFCN GGSCQDGVGS FSCSCLPGFA GPRCARDVDE CLSNPCGPGT
 901 CTDHVASFTC TCPPGYGGFH CEQDLFDCSP SSCFNNGTCV DGVNSFSCLC RPYGTGAHCQ
 961 HEADPCLSRP CLHGGVCSAA HPGFRCTCLE SFTGQCQTL VDWCSRQPCQ NGGRCVQGA
 1021 YCLCPPGWSG RLCDIRSLPC REAAAQIGVR LEQLCQAGGQ CVDEDESSHVC VCEPGRGTGSH
 1081 CEQEVDPCLA QPCQHGCTCR GYMGGYMCEC LPGAINDNCE DDVDECASQP CQHGGSCIDL
 1141 VARYLCSCPP GTLGVLCEN EDDCGPGPPL DSGPRCLHNG TCVDLVGGFR CTCPPGYTGL
 1201 RCEADINECR SGACHAAHTR DCLQDPGGGF RCLCHAGFSG PRCQTVLSPC ESQPCQHGQ
 1261 CRPSPGPGGG LTFTCHCAQP FWGPRCERVA RSCRELQCPV GVPCCQTPRG PRCACPPGLS
 1321 GPSCRSPFGS PPGASNASCA AAPCLHGGSC RPAPLAPFFR CACAQGWTFP RCEAPAAAPE
 1381 **VSE*****EPRC*****PRA** **ACQAKRGDQR** **CDRECNSPGC** **GWDGGDCSL****S** **VGDPWRQCEA** **LQCWRLFNN****S**
1441 **RCDPACSSPA** **CLYDNFDCHA** **GGRERTCNPV** **YEKYCADHFA** **DGRCDQGCNT** **EECGWDGLDC**
1501 **ASE**VPELLAR GVLVLTVLLP PEELLRSSAD FLQRLSAILR TSLRFRIDAQ GQAMVFPYHR
 1561 PSPGSEPRAR RELAPEVIGS VMLEIDNRL CLQSPENDHC FPDAQSAADY LGALSAVERL
 1621 DFPYPLRDVR GEPLPEPEPS VPLLELLVAG AVLLLVILVL GVMVARRKRE HSTLWFPEGF
 1681 SLHKDVASGH KGRREPVGQD ALGKMNMAKG ESLMGEVATD WMDTECPKAK RLKVEEPGMG
 1741 AEEAVDCRQW TQHHLVAADI RVAPAMALTP PQGDADADGM DVNVRGPDGF TPLMLASFCG
 1801 GALEPMPTEE DEADDTASAI ISDLICQGAQ LGARTDRTGE TALHLAARYA RADAARLLD
 1861 AGADTNAQDH SGRTPHHTAV TADAQGVFQI LIRNRSTDLD ARMADGSTAL ILAARLAVEG
 1921 MVEELIASHA DVNAVDELGK SALHWAAAVN NVEATLALLK NGANKDMQDS KEETPLFLAA
 1981 REGSYEAAKL LLDHFANREI TDHLDRLPRD VAQERLHQDI VRLLDQPSGP RSPPGPHGLG
 2041 PLLCPPGAFI PGLKAAQSGS KKSRRPFGKA GLGPQGRGR GKKLTLACPG PLADSSVTLS
 2101 FVDSLDSRPP FGGPPASPGG FPLEGPIAAA TATAVSLAQL GPGPRAGLGR QPPGGCVLSL
 2161 GLLNPVAVPL DWARLPPPAP PGPSFLLPLA PGPQLLNPGT PVSQERPPP YLAVPGHGEE
 2221 YPVAGAHSSP PKARFLRVPS EHPYLTPSPE SPEHWASPS PSLSDWSEST PSPATATGAM
 2281 ATTTGALPAQ PLPLSVPSL AQAQTQLGPQ PEVTPKRQVL A (SEQ ID NO 1)

FIGURA 2B

322	V C V N G W T G E D C S E N I D D C A S A A C F H G A T C H	Notch1.pro
325	V C V N G W S G D D C S E N I D D C A F A S C T P G S T C I	Notch2.pro
301	V C V N G W T G E S C S Q N I D D C A T A V C F H G A T C H	Notch3.pro
341	V C V S G W G G T S C E E N L D D C I A A C A P G S T C I	Notch4.pro
352	D R V A S F Y C E C P H G R T G L L C H L N D A C I S N P C	Notch1.pro
355	D R V A S F S C M C P E G K A G L L C H L D D A C I S N P C	Notch2.pro
331	D R V A S F Y C A C P M G K T G L L C H L D D A C V S N P C	Notch3.pro
371	D R V G S F S C L C P P G R T G L L C H L E D M C L S Q P C	Notch4.pro
382	N E G S N C D T N P V N G K A I C T C P S G Y T G P A C S Q	Notch1.pro
385	H K G A L C D T N P L N G Q Y I C T C P Q G Y K G A D C T E	Notch2.pro
361	H E D A I C D T N P V N G R A I C T C P P G F T G G A C D Q	Notch3.pro
401	H G D A Q C S T N P L T G S T L C L C Q P G Y S G P C H Q	Notch4.pro
412	D V D E C S L G - - - A N P C E H A G K C - N T L G S F E C	Notch1.pro
415	D V D E C A M A N - - - S N P C E H A G K C V N T D G A F H C	Notch2.pro
391	D V D E C S I G - - - A N P C E H L G R C V N T Q G S F L C	Notch3.pro
431	D L D E C L M A Q Q G P S P C E H G G S C L N T P G S F N C	Notch4.pro
439	Q C L Q G Y T G P R C E I D V N E C V S N P C Q N D A T C L	Notch1.pro
443	E C L K G Y A G P R C E M D I N E C H S D P C Q N D A T C L	Notch2.pro
418	Q C G R G Y T G P R C E T D V N E C L S G P C R N Q A T C L	Notch3.pro
461	L C P P G Y T G S R C E A D H N E C L S Q P C H P G S T C L	Notch4.pro
469	D Q I G E F Q C I C M P G Y E G V H C E V N D E C A S S P	Notch1.pro
473	D K I G G F T C I C M P G F K G V H C E L E N K C Q S N P	Notch2.pro
448	D R I G Q F T C I C M A G F T G T Y C E V D D E C Q S S P	Notch3.pro
491	D T T A T F H C T C P F G I R G Q I C R V E N R C A S A P	Notch4.pro
499	C I H N G R C I D K I N H F Q C F C P T G F G H I C Q Y D	Notch1.pro
503	C V N N G Q C V D K V N R F Q C L C P P G F G P V C Q I D	Notch2.pro
478	C V N G G V C K D R V N G F S C T C P S G F S G S T C Q L D	Notch3.pro
521	C L N H A D C H D L L N G F Q C I C L P G F S G R C E E D	Notch4.pro
529	V D E C A S T P C K N G A K C L D C P N Y C V C E G Y	Notch1.pro
533	I D D C S S T P C L N G A K C I D H P N G Y E C Q C A T G F	Notch2.pro
508	V D E C A S T P C R N G A K C V D Q P D G Y E C R C A E G F	Notch3.pro
551	I D E C R S S P C A N G G Q C Q D Q P - - - - - - - - -	Notch4.pro
559	T G T H C E V D I D E C D P D P C H Y G S C K D G V A T F T	Notch1.pro
563	T G V L C E E N I D N C D P D P C H H G Q C Q D G I D S Y T	Notch2.pro
538	E G T L C D R N V D D C S P D P C H H G R C V D G I A S F S	Notch3.pro
570	- G A F H	Notch4.pro
589	C L C R P G Y T G H H C E T N I N E C S S Q P C R H G G T C	Notch1.pro
593	C I C N P G Y M G A I C S D Q I D E C Y S S P C L N D G R C	Notch2.pro
568	C A C A P G Y T G T R C E S Q V D E C R S Q P C R H G G K C	Notch3.pro
574	C K C L P G F E G P R C Q T E V D E C L S D P C P V G A S C	Notch4.pro
619	Q D R D N A Y L C F C L K G T T G P N C E N L D D C A S S	Notch1.pro
623	I D L V N G Y Q C N C Q P G T S G V N C E N F D D C A S N	Notch2.pro
598	L D L V D K Y L C R C P S G T T G V N C E V N I D D C A S N	Notch3.pro
604	L D L P G A F F C L C P S - - - - - - - - - - - - - - -	Notch4.pro
649	P C D S G T C L D K I D G Y E C A C E P G Y G S M C N I N	Notch1.pro
653	P C I H G I C M D G I N R Y S C V C S P G F G Q R C N I D	Notch2.pro
628	P C T F G V C R D G I N R Y D C V C Q P G F G P L C N V E	Notch3.pro
617	- G P G Q L C E V P	Notch4.pro

FIGURA 2C

679	I D E C A G N P C F N G G T C E D G I N G F T C R C P E G Y	Notch1.pro
683	I D E C A S N P C R K G A T C I N G V N G F R C I C P E G P	Notch2.pro
658	I N E C A S S P C G E G G S C V D G E N G F R C L C P P G S	Notch3.pro
627	L - - C A P N L C Q P K Q I C K D Q K D K A N C L C P D G -	Notch4.pro
709	H D P T C L S E V N E C N S N P C V H G A C R D S L N G Y K	Notch1.pro
713	H H P S C Y S Q V N E C L S N P C I H G N C T G G L S G Y K	Notch2.pro
688	L P P L C L P P S E P C A H E P C S H G I C Y D A P G G F R	Notch3.pro
654	- S P G C A P P E D N C T - - - C H H G H C Q R S S - - -	Notch4.pro
739	C D C D P G W S G T N C - - D I N N N E C E S N P C V N G G	Notch1.pro
743	C L C D A G W V G I N C - - E V D K N E C L S N P C Q N G G	Notch2.pro
718	C V C E P G W S G P R C S Q S L A R D A C E S Q P C R A G G	Notch3.pro
676	C V C D V G W T G P E C - - E A E L G G C I S A P C A H G G	Notch4.pro
767	T C K D M T S G Y V C T C R E G F S G P N C Q T N I N E C A	Notch1.pro
771	T C D N L V N G Y R C T C K K G F K G Y N C Q V N I D E C A	Notch2.pro
748	T C S S D G M G F H C T C P P G V Q G R Q C E L - - -	Notch3.pro
704	T C Y P Q P S G Y N C T C P T - - - - - - - - - - -	Notch4.pro
797	S N P C L N Q C T C I D D V A G Y K C N C L L P Y T G A T C	Notch1.pro
801	S N P C L N Q G T C F D D I S G Y T C H C V L P Y T G K N C	Notch2.pro
772	- -	Notch3.pro
719	- -	Notch4.pro
827	E V V L A P C A P S P C R N G G E C R Q S E D Y E S F S C V	Notch1.pro
831	Q T V L A P C S P N P C E N A A V C K E S P N F E S Y T C L	Notch2.pro
772	- - - L S P C T P N P C K H G G R C K S A P G - Q I P V C S	Notch3.pro
719	- -	Notch4.pro
857	C P T G W Q A G Q T C E V D I N E C V L - S P C R I I G A S C	Notch1.pro
861	C A P G W Q G - Q R C T I D I D E C I S - K P C M N H G I C	Notch2.pro
798	C P Q G W Q G - P R C Q Q D V D E C A G P A P C G P H G I C	Notch3.pro
719	- -	Notch4.pro
886	Q N T E G G Y R C H C Q A G Y S G R N C E T D I D D C R P N	Notch1.pro
889	H N T Q G S Y M C E C P P G F S G M D C E E D I D D C L A N	Notch2.pro
827	T N L A G S F S C T C H G G Y T G P S C D Q D I N D C D P N	Notch3.pro
719	- -	Notch4.pro
916	P C H N G G S C T D G I N T A F C D C L P G F R G T F C E E	Notch1.pro
919	P C Q N G G S C M D G V N T F S C L C L P G F T G D K C Q T	Notch2.pro
857	P C L N G G S C Q D G V G S F S C S C L P G F A G P R C A R	Notch3.pro
736	P C L N G G S C N P S P G G Y Y C T C P P S H T G P Q C Q T	Notch4.pro
946	D I N E C A S D P C R N G A N C T D C V D S Y T C T C P A G	Notch1.pro
949	D M N E C L S E P C K N G G T C S D Y V N S Y T C K C Q A G	Notch2.pro
887	D V D E C L S N P C G P G - T C T D H V A S F T C T C P P G	Notch3.pro
766	S T D Y C V S A P C - - - - - - - - - - - - - - - - -	Notch4.pro
976	F S G I H C E N N T P D C T E S S C F N G G T C V D G I N S	Notch1.pro
979	F D G V H C E N N I N E C T E S S C F N G G T C V D G I N S	Notch2.pro
916	Y G G F H C E Q D L P D C S P S S C F N G G T C V D G V N S	Notch3.pro
776	- -	Notch4.pro
1006	F T C L C P P G F T G S Y C Q H D V N - E C D S Q P C L H G	Notch1.pro
1009	F S C L C P V G F T G S F C L H E I N - E C S S H P C L N E	Notch2.pro
946	F S C L C R P G Y T G A H C Q H E A D - P C L S R P C L H G	Notch3.pro
788	F S C L C A M G F Q G P R C E G K L R P S C A D S P C R N R	Notch4.pro

FIGURA 2D

1035	G T C Q D G C G S Y R C T C P Q G Y T G P N C Q N L V H W C	Notch1.pro
1038	C T C V D C L C T Y R C S C P L G Y T C K N C Q T L V N C	Notch2.pro
975	G V C S A A H F G F R C T C L E S F T G P Q C Q T L V D W C	Notch3.pro
818	A T C Q D S P Q G F R C L C P T G Y T G G S C Q T L M D C	Notch4.pro
1065	D S S P C K N G G K C W Q T H T Q Y R C E C P S G W T G L Y	Notch1.pro
1068	S R S P C K N K G T C V Q K K A E S Q C L C P S G W A G A Y	Notch2.pro
1005	S R Q P C Q N G G R C V Q T G - - A Y C L C P P G W S G R L	Notch3.pro
848	A Q K P C P R N S H C L Q T G P S F H C L C L Q G W T G P L	Notch4.pro
1095	C D V P S V S C E V A A Q R Q G V D V A R L C Q H G G L C V	Notch1.pro
1098	C D V P N V S C D I A A S R R G V L V E H L C Q H S G V C I	Notch2.pro
1033	C D I R S L P C R E A A A Q I G V R L E Q L C Q A G G Q C V	Notch3.pro
878	C N L P L S S C Q K A A L S Q G I D V S S L C H N G G L C V	Notch4.pro
1125	D A G N T H H C R C Q A G Y T G S Y C E D L V D E C S P S P	Notch1.pro
1128	N A G N T H Y C V C P L G Y T G S Y C L E Q L D E C A S N	Notch2.pro
1063	D E D S S H Y C Q C P E G R T G S H C E Q E V D P C L A Q P	Notch3.pro
908	D S G P S Y F C H C P P G F Q G S L C Q D H V N P C E S R P	Notch4.pro
1155	C Q N G A T C T D Y L G G Y S C K C V A G Y H G V N C S E E	Notch1.pro
1158	C Q H G A T C S D F I G G Y R C E C V P G Y Q G V N C E Y E	Notch2.pro
1093	C Q H G G T C R G Y M G G Y M C E C L P G Y N G D N C E D D	Notch3.pro
938	C Q N G A T C M A Q P S G Y L C Q C A P G Y D G Q N C S K E	Notch4.pro
1185	I D E C L S H P C Q N C G T C L D L P N T Y K C S C P R C T	Notch1.pro
1188	V D E C Q N Q P C Q N G G T C I D L V N H F K C S C P P G T	Notch2.pro
1123	V D E C A S Q P C Q E G G S C I D L V A R Y L C S C P P G T	Notch3.pro
968	I D A C Q S Q P C H N - - - - - - - - - - - - - - - - - -	Notch4.pro
1215	Q G V H C E I N V D D C N P P V D P V S R S P K C F N N G T	Notch1.pro
1218	R G L L C E E N I D D C - - - - - A R G P H C L N G G Q	Notch2.pro
1153	L G V L C E I N E D D C G P G - P P L D S G P R C L H N G T	Notch3.pro
979	- H G T	Notch4.pro
1245	C V D Q V G G Y S C T C P P G F V G E R C E G D V N E C L S	Notch1.pro
1241	C M D R I C C Y S C R C L P G P A C E R C E C D I N E C L S	Notch2.pro
1182	C V D L V G G F R C T C P P G Y T G L R C E A D I N E C R S	Notch3.pro
982	C T P K P G G F H C A C P P G F V G L R C E G D V D E C L D	Notch4.pro
1275	N P C D A R G T Q N C V Q R V N - D F H C E C R A G H T G R	Notch1.pro
1271	N P C S S E G S I D C I Q L T N - D Y L C V C R S A F T G R	Notch2.pro
1212	G A C H A A H T R D C L Q D P G G F R C L C H A G F S G P	Notch3.pro
1012	Q P C H P T G T A A C E S L A N - A F Y C Q C L P G H T G Q	Notch4.pro
1304	R C E S V I N G C K G K P C K N G G T C A V A S N T A R G -	Notch1.pro
1300	H C E T F V E V C P Q M P C L N G G T C A V A S N M P D G -	Notch2.pro
1242	R C Q T V L S P C E S Q P C Q H G G Q C R P S P G P G G G L	Notch3.pro
1041	W C E V E I C P C H S Q P C F H G G T C E A T A G S P L G -	Notch4.pro
1333	- F T C K C P A G F R G A T C R N D A R - C G S L R C - N G	Notch1.pro
1329	- F I C R C P F G F S G A R C Q S - - - S C G Q V K C R K G	Notch2.pro
1272	T F T C H C A Q E F W G P R C E R V A R S C R E L Q C P V G	Notch3.pro
1070	- F I C H C P K G F E G P T C S H R A P S C G F H H C H H G	Notch4.pro
1362	G T C I S G P R S - - - P T C L C L G P F T G P E C Q F P A	Notch1.pro
1355	E Q C V H T A S G - - - P R C F C P S P R D - - - C E S G C	Notch2.pro
1302	V P C Q Q T P R G - - - P R C A C P P G L S G P S C R S F P	Notch3.pro
1099	G L C L P S P K P G F P P R C A C L S G Y G G P D C L T P P	Notch4.pro

FIGURA 2E

1389	S	S	P	-	-	-	-	-	-	C	L	G	G	N	P	C	Y	N	Q	G	T	C	E	P	T	S	-	-	E	S	Notch1.pro			
1379	A	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	P	C	Q	H	G	C	S	C	H	P	Q	R	-	-	Q	P	Notch2.pro		
1329	G	S	P	P	G	A	S	N	A	S	C	A	A	A	A	P	C	L	H	G	G	S	C	R	P	A	P	-	-	L	A	Notch3.pro		
1129	A	P	K	G	-	-	-	-	-	-	C	C	P	P	S	P	C	L	Y	N	C	S	C	S	E	T	T	C	L	C	C	Notch4.pro		
1411	P	F	Y	R	C	L	C	D	A	K	F	N	G	L	L	C	H	I	L	D	Y	S	F	G	G	G	A	G	R	D	Notch1.pro			
1396	P	Y	Y	S	C	Q	C	A	P	P	F	S	G	S	R	C	R	T	Y	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch2.pro			
1357	P	F	F	R	C	A	C	A	Q	G	W	T	G	P	R	C	E	A	P	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	Notch3.pro			
1154	P	G	F	R	C	S	C	P	H	S	S	P	G	P	R	C	Q	K	F	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro			
1441	I	P	P	P	T	I	F	F	A	C	F	L	P	R	C	Q	R	D	A	G	N	K	V	C	S	T	Q	C	N	N	Notch1.pro			
1416	A	P	P	S	T	P	P	A	T	C	L	S	Q	Y	C	A	D	K	A	R	D	G	V	C	D	E	A	C	N	S	Notch2.pro			
1378	A	P	H	V	S	-	-	P	R	C	P	R	A	A	C	Q	A	K	R	G	U	Q	R	C	D	R	K	C	N	S	Notch3.pro			
1174	-	-	-	-	A	X	G	-	-	-	-	-	-	-	-	C	E	G	R	S	E	D	G	A	C	D	A	G	C	S	G	Notch4.pro		
1471	H	A	C	G	W	D	G	G	D	C	S	L	N	F	N	D	F	W	K	K	C	T	Q	S	L	Q	C	W	K	Y	Notch1.pro			
1446	H	A	C	Q	W	D	G	G	D	C	S	L	T	M	E	N	F	W	A	K	C	S	S	P	L	P	C	W	D	Y	Notch2.pro			
1408	P	G	C	G	W	D	G	G	D	C	S	L	S	V	G	D	F	W	R	Q	C	-	E	A	L	Q	C	W	R	L	Notch3.pro			
1193	P	G	G	N	W	D	G	G	D	C	S	L	G	V	P	D	F	W	K	G	C	P	S	H	S	R	C	W	L	L	Notch4.pro			
1501	F	S	D	G	H	C	D	S	Q	C	N	S	A	G	C	L	F	D	G	F	D	C	Q	R	A	-	-	E	G	Q	Notch1.pro			
1476	I	N	N	-	Q	C	D	E	L	C	N	T	V	E	C	L	F	D	N	F	E	C	Q	G	N	-	-	S	K	T	Notch2.pro			
1437	F	N	N	S	R	C	D	P	A	C	S	S	P	A	C	L	Y	D	N	F	D	C	E	A	G	G	R	E	R	T	Notch3.pro			
1223	F	R	D	G	Q	C	H	P	Q	C	D	S	E	E	C	L	F	D	G	Y	D	C	E	T	P	-	-	-	P	A	Notch4.pro			
1529	C	N	P	L	Y	D	Q	Y	C	K	D	H	F	S	D	G	H	C	D	Q	G	C	N	S	A	E	C	E	W	D	Notch1.pro			
1503	C	K	-	-	Y	D	K	Y	C	A	D	H	F	K	D	N	H	C	D	Q	G	C	N	S	E	E	C	G	W	D	Notch2.pro			
1467	C	N	P	V	Y	E	X	Y	C	A	D	H	F	A	D	G	R	C	D	Q	G	C	N	T	E	E	C	G	W	D	Notch3.pro			
1250	C	T	P	A	Y	D	Q	Y	C	H	D	H	F	H	N	G	H	C	E	K	G	C	N	T	A	E	C	G	W	D	Notch4.pro			
1559	G	L	D	C	A	E	H	V	P	E	R	L	A	A	G	T	L	V	V	V	V	L	M	P	P	E	Q	L	R	N	Notch1.pro			
1531	G	L	D	C	A	A	D	Q	P	E	N	L	A	E	G	T	L	V	I	V	V	L	M	P	P	E	Q	L	L	Q	Notch2.pro			
1497	G	L	D	C	A	S	E	V	P	A	L	L	A	R	G	V	L	V	L	T	V	L	L	P	P	E	E	L	L	R	Notch3.pro			
1280	G	G	D	C	R	P	E	D	G	D	P	E	W	G	P	S	L	A	L	L	V	V	L	S	P	P	A	L	D	Q	Notch4.pro			
1589	S	S	F	H	F	L	R	E	L	S	R	V	L	H	T	N	V	V	F	K	R	D	A	H	G	Q	Q	M	I	F	Notch1.pro			
1561	D	A	R	S	F	L	R	A	L	G	T	L	L	H	T	N	I	R	I	K	R	D	S	Q	G	E	L	M	V	Y	Notch2.pro			
1527	S	S	A	D	F	L	Q	R	L	S	A	I	L	R	T	S	L	R	F	R	L	D	A	H	G	Q	A	M	V	F	Notch3.pro			
1310	Q	L	F	A	L	A	R	V	L	S	L	T	L	R	V	G	L	W	V	R	K	D	R	D	G	R	D	M	V	Y	Notch4.pro			
1519	P	Y	Y	G	R	E	E	E	L	R	K	H	P	I	K	R	A	A	E	G	W	A	A	P	D	A	L	L	G	Q	Notch1.pro			
1591	P	Y	Y	G	E	K	S	A	A	M	K	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	Notch2.pro			
1557	P	Y	H	R	P	S	P	C	S	E	P	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch3.pro				
1340	P	Y	P	G	A	R	A	E	E	K	L	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	T	R	D	P	T	Y	Q	E	R	Notch4.pro
1649	V	K	A	S	L	L	P	G	G	S	E	G	G	R	R	R	R	E	L	D	P	M	D	V	R	G	S	I	V	Y	Notch1.pro			
1605	M	T	R	R	S	L	P	G	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch2.pro			
1569	A	R	R	E	L	A	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch3.pro			
1362	A	A	P	Q	T	Q	P	L	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro			
1679	L	E	I	D	N	R	Q	C	V	Q	-	-	A	S	S	Q	C	F	Q	S	A	T	D	V	A	A	F	L	G	A	Notch1.pro			
1625	L	E	I	D	N	R	Q	C	V	Q	-	-	D	S	D	H	C	F	K	K	T	D	A	A	A	A	I	I	A	S	Notch2.pro			
1584	L	E	I	D	N	R	L	C	L	Q	S	P	E	N	D	H	C	F	P	D	A	Q	S	A	A	D	Y	L	G	A	Notch3.pro			
1384	M	G	V	D	I	S	R	C	G	P	D	H	P	A	S	R	C	P	W	D	P	G	I	I	I	R	F	I	A	A	Notch4.pro			
1707	L	A	S	L	G	S	L	N	-	-	I	P	Y	K	I	E	A	V	Q	S	E	T	V	E	P	P	P	P	-	-	Notch1.pro			
1653	H	A	I	Q	G	T	L	S	-	-	Y	P	-	-	L	V	S	V	V	S	E	S	L	T	P	-	-	-	-	-	Notch2.pro			
1614	I	S	A	V	-	-	I	D	-	-	F	P	Y	P	I	R	D	V	R	G	F	P	I	E	P	P	E	-	-	-	Notch3.pro			
1414	M	A	A	V	G	A	L	E	P	L	L	P	G	P	L	L	A	V	H	P	H	A	G	T	A	P	P	A	N	Q	Notch4.pro			

FIGURA 2F

1733	- A Q I H F M Y V A A A A F V I I F F V G C G V I I S R K R	Notch1.pro
1674	- E R T Q L L Y L L A V A V V I I L F I I L L G V I M A K R	Notch2.pro
1639	- P S V P L L P L L V A G A V L L L V I L V L G V M V A R R	Notch3.pro
1444	L P W P V L C S P V A G V I L L A L G A L L V L Q L I R R R	Notch4.pro
1762	R R Q H G Q L W F P E G F K V S - E A S K - - K K R R E P L	Notch1.pro
1703	K R K H G S L W L P E G F T L R R D A S N - - H K R R E P V	Notch2.pro
1668	K R E H S T L W F P E G F S L H K D V A S G H K G R R E P V	Notch3.pro
1474	R R E H G A L W L P P G F T R R P R T Q S A P H R R R P P L	Notch4.pro
1789	G E D S V G L K P L K N - A S D G A L M D D N Q N E - - W G	Notch1.pro
1731	G Q D A V G L K N L S V Q V S E A N L I G T G T S E H W V D	Notch2.pro
1698	G Q D A L G M K N M A K - - G E S L M G E V A T D - W M D	Notch3.pro
1504	G E D S I G L K A L K P - - - - - K A E V D E D G - V V M	Notch4.pro
1816	D E D L E T K K F R F E E P V V L P D L D D Q T D H R Q W T	Notch1.pro
1761	D E G P Q P K K V K A E D E A L L S E E D D P I D R R P W T	Notch2.pro
1724	T E C P E A K R L K V E E P G M G - - A E E A V D C R Q W T	Notch3.pro
1527	C S G P E - - - - E G E E V G Q A E E T G P P S T C Q L W S	Notch4.pro
1846	Q Q H L D A A D L R - M S A M A P T P P Q G E V D A D C M D	Notch1.pro
1791	Q Q H L E A A D I R R T P S L A L T P P Q A E Q E V D V L D	Notch2.pro
1752	Q H H L V A A D I R V A P A M A L T P P Q G D A D A D G M D	Notch3.pro
1553	L S G G C G A L P Q - - - A A M L T P P Q - E S E M E A P D	Notch4.pro
1875	V N V R G P D G F T P L M I A S C S G G G L E T G N S E E -	Notch1.pro
1821	V N V R C P D C C T P L M L A S L R C C S S D L S D E D E D	Notch2.pro
1782	V N V R G P D G F T P L M L A S F C G G A L E P M P T E E D	Notch3.pro
1579	L D T R G P D G V T P I M S A V C C G - F V Q S G T P Q G -	Notch4.pro
1904	- - E E D A P A V I S D F I Y Q G A S L H N Q T D R T G E T	Notch1.pro
1851	- A E D S S A N I I D L V Y Q G A S L Q A Q T D R T G E M	Notch2.pro
1812	E A D D T S A S I I S D L I C Q G A Q L G A R T D R T G E T	Notch3.pro
1607	- A W L G C P E P W E P L L D G G A C P Q A H T V G T G E T	Notch4.pro
1932	A L H L A A R Y S R S D A A K R L L E A S A D A N I Q D N M	Notch1.pro
1880	A L H L A A R Y S R A D A A K R L L D A G A D A N A Q D N M	Notch2.pro
1842	A L H L A A R Y A R A D A A K R L L D A G A D T N A Q D H S	Notch3.pro
1636	P L H L A A R F S R P T A A R R L L E A G A N P N Q P D R A	Notch4.pro
1962	G R T P L H A A V S A D A Q G V F Q I L I R N R A T D L D A	Notch1.pro
1910	G R C P L H A A V A A D A Q G V F Q I L I R N R V T D L D A	Notch2.pro
1872	G R T P L H T A V T A D A Q G V F Q I L I R N R S T D L D A	Notch3.pro
1666	G R T P L H A A V A A D A R E V C Q L L L R S R Q T A V D A	Notch4.pro
1992	R M H D G T T P L I L A A R L A V E G M L E D L I N S H A D	Notch1.pro
1940	R M N D G T T P L I L A A R L A V E G M V A E L I N C Q A D	Notch2.pro
1902	R M A D G S T A L I L A A R L A V E G M V E E L I A S H A D	Notch3.pro
1696	R T E D G T T P L M L A A R L A V E D L V E E L I A A Q A D	Notch4.pro
2022	V N A V D D L G K S A L H W A A A V N N V D A A V V L L K N	Notch1.pro
1970	V N A V D D H G K S A L H W A A A V N N V E A T L L L L K N	Notch2.pro
1932	V N A V D E L G K S A L H W A A A V N N V E A T L A L L K N	Notch3.pro
1726	V G A R D K W G K T A L H W A A A V N N A R A A R S L L Q A	Notch4.pro
2052	G A N K D M Q N N R E E T P L F L A A R E G S Y E T A K V I	Notch1.pro
2000	G A N R D M Q D N K E E T P L F L A A R E G S Y E A A K I I	Notch2.pro
1962	G A N K D M Q D S K E E T P L F L A A R E G S Y E A A K L L	Notch3.pro
1756	G A D K D A Q D N R E Q T P L F L A A R E G A V E V A Q L L	Notch4.pro

FIGURA 2G

2082	L D H F A N R D I T D H M D R L P R D I A Q E R M H H D I V	Notch1.prc
2030	L D H F A N R D I T D H M D R L P R D V A R D R M H H D I V	Notch2.prc
1992	L D H F A N R E I T D H L D R L P R D V A Q E R L H Q D I V	Notch3.prc
1786	L G L G A A R E L R D Q A G L A P A D V A H Q R N H W D L L	Notch4.prc
2112	R L L D E Y N L V R S P Q L H G A P L G G T P T L S P P L C	Notch1.prc
2060	R L L D E Y N V T P S P - - P G T V L - - T S A L S P V I C	Notch2.prc
2022	R L L D Q P S G P R S P - - P G P H G - - - - L G P L L C	Notch3.prc
1816	T L L E G A G P P E A R - - - - - - - - - - - - - - - -	Notch4.prc
2142	S P N G Y L G S L K P G V Q G - K K V R K P S S K - - - -	Notch1.prc
2086	G P N R S F L S L K H T P M G - K K S R R P S A K S T M P T	Notch2.prc
2045	P P G A F L P G L K A A Q S G S K K S R R P P G K - - - -	Notch3.prc
1828	- - - - - - - - - H X A T P G R E A G P F P R A R - - - -	Notch4.prc
2166	G L A C G S K E A K D L K - A R R K K S Q D G K G C L L D S	Notch1.prc
2115	S L P N L A K E A K D A K G S R R K K S L S E K V Q L S E S	Notch2.prc
2070	- - - - A G L G P Q G P R G R G K K L T L A C P G P L A D S	Notch3.prc
1844	- V	Notch4.prc
2195	S G M L S P V D S L E S P H G Y L S D V A S P P L L P S P -	Notch1.prc
2145	S V T L S P V D S L E S P H T Y V S D T T S S P M I T S P G	Notch2.prc
2096	S V T L S P V D S L D S P R P F G G P P A S P G G F P - - -	Notch3.prc
1846	S V S V P P H G G G A L P R C R I L S A G A G P R G G - - -	Notch4.prc
2224	F Q Q S P S V P L N H L P G M P D T H L G I G H L N V A A K	Notch1.prc
2175	I L Q A S P N P M L A T A A P P A P V H A Q H A L S F S N L	Notch2.prc
2123	- -	Notch3.prc
1873	- -	Notch4.prc
2254	P E M A A L G G G G R L A F E T G P P R L S H L P V A S G T	Notch1.prc
2205	H E M Q P L A E G A S T V L P S V S Q L L S H H H I V S - -	Notch2.prc
2135	V S L A Q L G G P G R A G L G R Q P P - - - - - - - - - -	Notch3.prc
1883	V D L A A R G G G A Y S H C R S L S G - - - - - - - - - -	Notch4.prc
2284	S T V L G S S S G G A L N F T V G G S T S L N G Q C E W L S	Notch1.prc
2233	- - - P G S G S A G S L S R - - - - - L H P V P V P A D W M N	Notch2.prc
2154	- - - - - G G C V L S L G L - - - - - L N P V A V P L D W A R	Notch3.prc
1902	- - - - - V G A G G - - - - - - - - - - - - - - - - - -	Notch4.prc
2314	R L Q S G M V P N Q Y N P L R G S V A P G P L S T Q A P S L	Notch1.prc
2256	R M E V N E T - - Q Y N E M F G M V L A P A E G T H P G - -	Notch2.prc
2175	- -	Notch3.prc
1908	- -	Notch4.prc
2344	Q H G M V G P L H S S L A A S A L S Q M M S Y Q G L P S T R	Notch1.prc
2282	- - - - - - - - - - - I A - - P - - - - - - - - - - - Q S R	Notch2.prc
2185	- -	Notch3.prc
1915	- -	Notch4.prc
2374	L A T Q P E L V Q T Q Q V Q P Q N L Q M Q Q Q N L Q P A N I	Notch1.prc
2288	P P E G X E I T T P R E P L P P - I V T F Q - - L I P K - -	Notch2.prc
2189	L A P G P Q L L N P G T P V S P - - - - - - - - - - - -	Notch3.prc
1915	- - - - - - - - - F S A G M R G P R - - - - - - - - - - -	Notch4.prc
2404	Q Q Q Q S L Q P P P P P P Q P H L G V S S A A S G H L G R S	Notch1.prc
2313	- - - G S I A Q P A G A P Q P Q S T C P P A V A G P L P T M	Notch2.prc
2205	- - - - Q E R P P P Y L A V P G H G E E Y P V A G - - - -	Notch3.prc
1924	- - - - - - - - - P N P A I M R G R Y G V A A G R G G - - - -	Notch4.prc

FIGURA 2H

2434	F L S G E	P	S Q A D V Q P	L	G P	S S	L A V H T I	L	P	Q	E S P	Noch1.pro
2340	Y Q - - -	P	- - - E M A R	L	P S V A F	P	T A	M M P Q	Q	D G Q	Noch2.pro	
2226	- - - - -	-	- - - - -	-	- - - - -	A H	S S	P	P	K A	R F L R - - - -	Noch3.pro
1942	- - - - -	-	- - - - -	-	- - - - -	-	- - - - -	-	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Noch4.pro
2464	A L	P T	S	L P	S S I V P	P V	T A A Q F L	T P P S Q H S Y	S	S	Noch1.pro	
2365	V A	Q T	I	L P	A Y H	P F	P A S	V G K Y	P T P P S Q H S Y	A S	Noch2.pro	
2238	- V	P	S E H	P	Y L T	P	S P E S	P E H	W A S	P S P P S L S D W	Noch3.pro	
1942	- - - - -	-	- - - - -	-	- - - - -	R	V S	T D D	W P	C D W V A L G A C G	Noch4.pro	
2494	P - - V D	N	T F S H	Q L Q V	P	-	E H P	F	L T P S P E S P D Q	Noch1.pro		
2395	S N A	A E R	T F S H	S G H L Q	G	-	E H P	Y	L T P S P E S P D Q	Noch2.pro		
2267	S - - -	E S T P S	P A T A T G	- - - A M A	T	- - -	T T G A L	P A Q	Noch3.pro			
1960	S - - -	A S N I P	- - - - -	I P	P	- - -	P C	L T P S P E R G S P	Noch4.pro			
2521	- W	S S S S P H S	N V	S D W S	E	G	V S	S P	P T S M Q S	Q	I A	Noch1.pro
2425	- W	S S S S P H S	-	A S D W S	D V T T	S	P	T P G G A G G G Q	Noch2.pro			
2291	P	L P L S V	P S S I	A Q A Q T	Q	L G	P Q	P	E V T P K R	Q	V L	Noch3.pro
1981	Q	L D C G P	P A L Q	E M P I N	Q	G G	E G K K	Noch4.pro				
2550	R	I P	E A F K	Noch1.pro								
2453	R	G P	G T H M S E P P H N N M Q V Y A	Noch2.pro								
2321	A	Noch3.pro										
2002	Noch4.pro											

FIGURA 3 Estadística de alineación de aminoácidos para Notch1-4

Porcentaje de identidad

		1	2	3	4	
Divergencia	1		56,1	52,7	42,6	1
	2	64,9		52,7	42,5	2
	3	73,0	72,9		43,4	3
	4	102,0	102,4	99,3		4
		1	2	3	4	

FIGURA 4A

Secuencia de región variable de cadena pesada del mAb 256A-13

SQVQLQQSGAELAKPGT SVKMACKAS GYTFTTHWMNWVKQRPGQGLEWIGTINPSNDF TDCN

CDR-H1

CDR-H2

QKFKDKAILTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCASGLT TARAWFAYWGQGL LVTVSAA

CDR-H3

(SEQ ID NO: 2)

FIGURA 4B

Secuencia de región variable de cadena ligera (kappa) del mAb 256A-13

RATISCRASQSVTTSNYSYMHWFQOKPGQPPKLLIKYASNLDSGVPARFSGSGSGTDFTLNI

CDR-L1

CDR-L2

HPVEEEDTATFYC QHSWEIPYTFGGGT NLEIKRADAAPT V (SEQ ID NO: 3)

CDR-L3

FIGURA 5 SEÑALIZACIÓN DE NOTCH3 INDEPENDIENTE DE LIGANDO

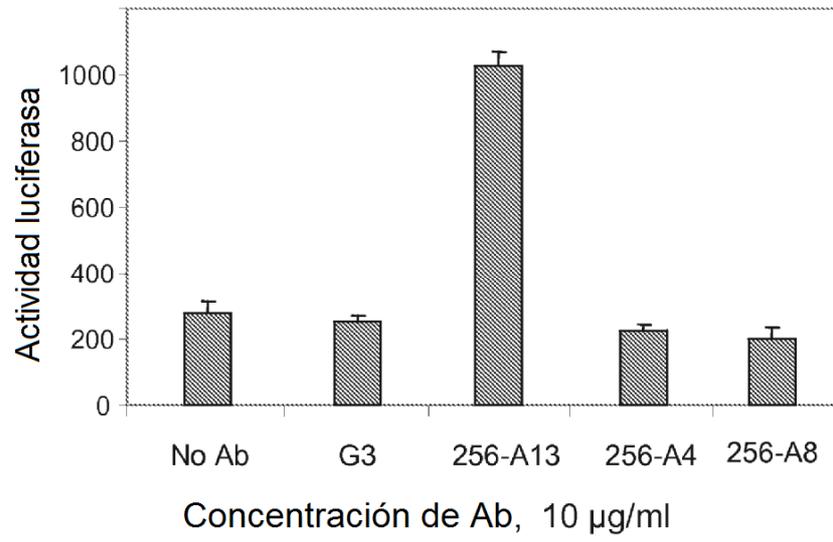
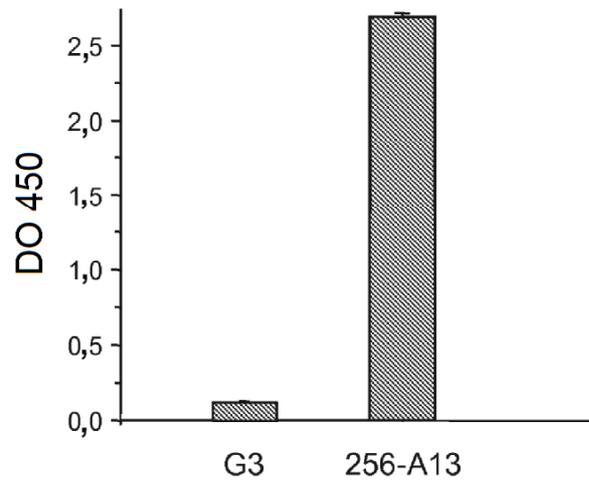


FIGURA 6 ESCISIÓN POR METALOPROTEASA DE NOTCH3



**FIGURA 7 CONSTRUCCIONES DE PROTEÍNA NOTCH3/FC
PARA MAPEO DE EPÍTOPOS**

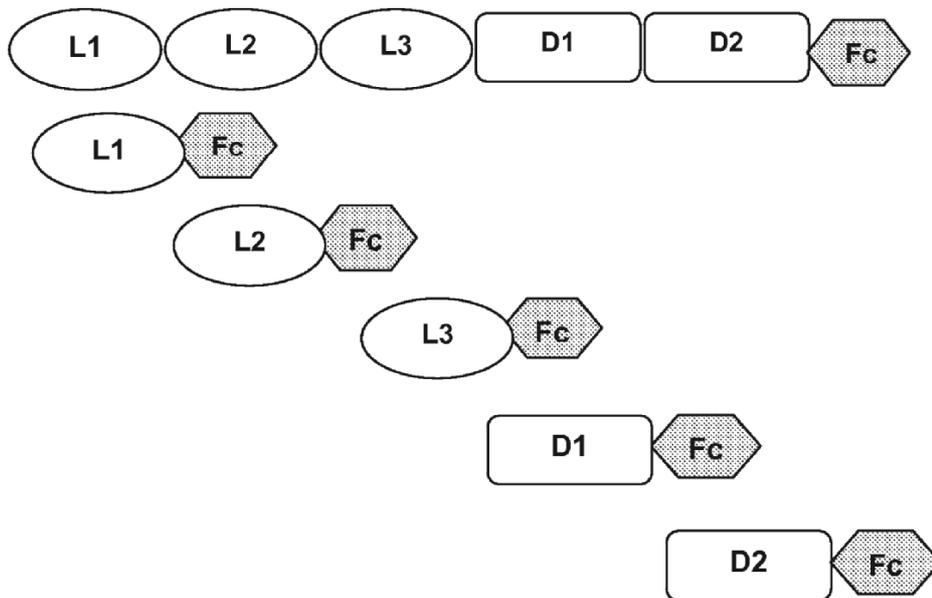


FIGURA 8A

1	A T G G G T C C A G G T G C A A G A G G	N3-leader Tanox.
1	A T G G G G C C G G G G G C C C G T G G	N3-leader NCBI.s
21	T A G A A G G C G T A G A A G G A G A C	N3-leader Tanox.
21	C C G C C G C C G C C G C C G T C G C C	N3-leader NCBI.s
41	C A A T G A G C C C A C C T C C T C C G	N3-leader Tanox.
41	C G A T G T C G C C G C C A C C G C C A	N3-leader NCBI.s
61	C C A C C T C C A G T G A G A G C A C T	N3-leader Tanox.
61	C C G C C A C C C G T G C G G G C G C T	N3-leader NCBI.s
81	G C C T T T G C T G T T G C T G C T G G	N3-leader Tanox.
81	G C C C C T G C T G C T G C T A G	N3-leader NCBI.s
101	C T G G A C C T G G T G C A G C A G C T	N3-leader Tanox.
101	C G G G G C C G G G G C T G C A G C C	N3-leader NCBI.s
121	C C T C C T T G C C T G G A C	N3-leader Tanox.
121	C C C C C T T G C C T G G A C	N3-leader NCBI.s

FIGURA 8B

M G P G A R G R R R R R R P M

S P P P P P P P V R A L P L L

L L L A G P G A A A P P C L D

FIGURA 8C

EPRCPRAACQ AKRGDQRCR ECNSPGCGWD GGDCSLSVG (SEQ ID NO 10)

FIGURA 8D

AKRGDQRCR ECNSPGCGWD GGDCSLSVG (SEQ ID NO 11)

FIGURA 9

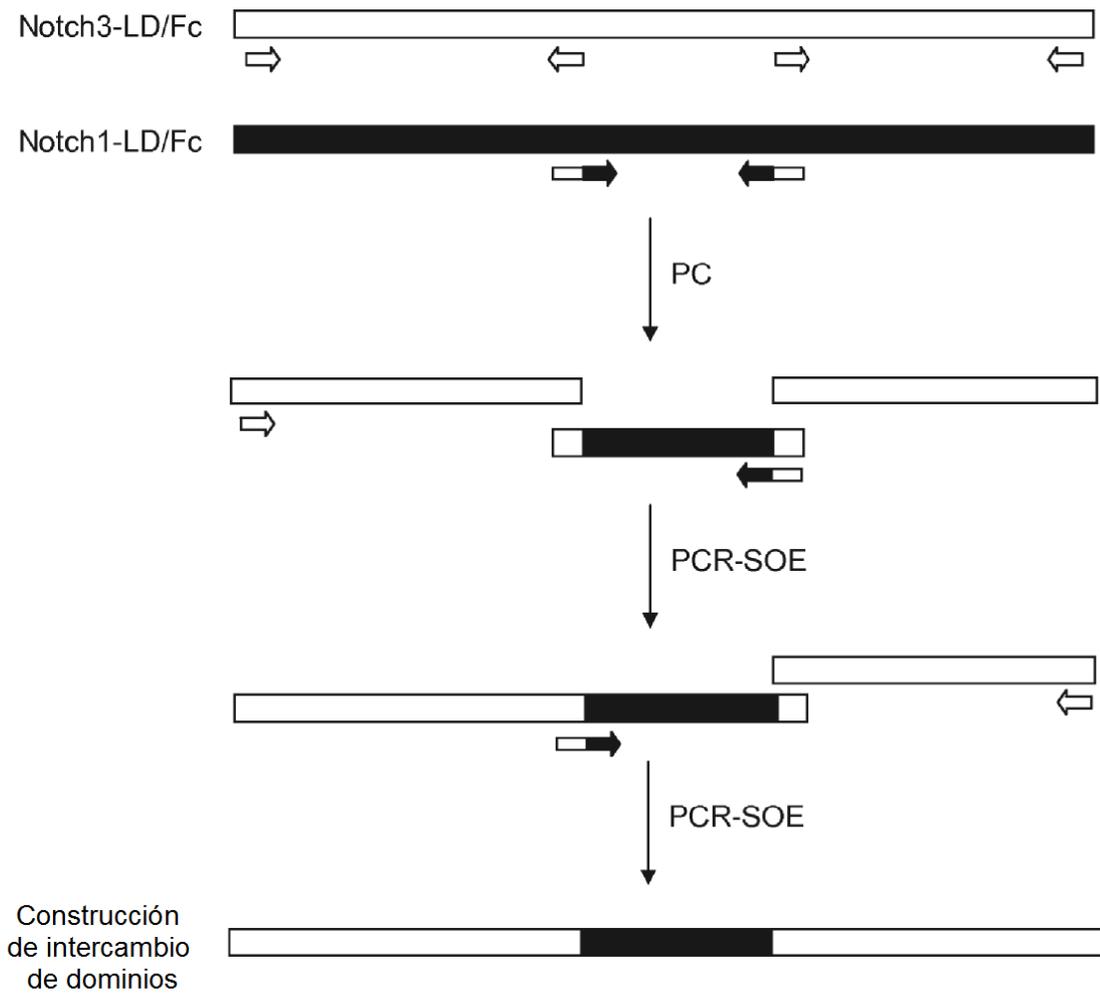


FIGURA 10 Resumen de la secuencia de intercambio de dominios e intercambio de grupos de aminoácidos (aa) en el primer dominio LIN12 y fuerza de unión del mAb en ensayos ELISA

Construcciones de expresión	ID de secuencia	Secuencias de tipo silvestre e intercambiadas del 1 ^{er} dominio LIN12 (L1) de Notch3	256A-13	G3	Hu-Fc	% de diferencia
Notch3-L1	10	EPRCPRAACQAKRGDQRCDRECNSEPGCGWDGGDCSLSVG	+++	-	+++	0
L1-sub1	14	-EACELPE-----	+++	-	+++	15,34
L1-sub2	15	-----EDAGNKVCS-----	+	-	+++	17,95
L1-aa swap1	17	-----EDA-----	+++	-	++	20,51
L1-aa swap2	18	-----NKV-----	+++	-	++	7,69
L1-sub3	16	-----LQCNNHACGWDGGDCSLNFN	+	-	+++	7,69
L1-aa swap3	19	-----SLQ-----	-	-	+++	7,69
L1-aa swap4	20	-----NHA-----	+++	-	+++	7,69
L1-aa swap5	21	-----NFN-----	+++	-	+++	7,69

En estos experimentos ELISA se usó la unión de mAb 256A-13 a Notch3-LD/Fc (L1) como control positivo, es decir, 100 % de unión. La lectura de unión para proteínas recombinantes con intercambio se comparó con la del patrón positivo. +++: >50 % de la unión del patrón; ++: 10-40 % de la unión del patrón; +: 10 % a mínima señal positiva; -: sin unión, es decir, lectura de unión media de mAb G3 +/- 3 x error típico. El mAb G3 es un mAb de control de IgG1 humana usado como control negativo

FIGURA 11 Péptidos de exploración con alanina para mapeo de epítomos de 256A-13

Construcciones de expresión	ID de secuencia	Secuencias de tipo silvestre e intercambiadas del 1º dominio LIN12 (L1) de Notch3
Notch3-L1	10	EPRCPRAACQAKRGDQRCDCRECNSPGCGWDGGDCSLSVG
AA-exploración 1	22	AACQAAAGDQRC
AA-exploración 2	23	ACQAKAADQRCDC
AA-exploración 3	24	CQAKRAAQRCDCR
AA-exploración 4	25	QAKRGAARCDRE
AA-exploración 5	26	AKRGDAACDREC
AA-exploración 6	27	KRGDQAADRECN
AA-exploración 7	28	RGDQRAARECNS
AA-exploración 8	29	GDQRCAAECNSP
AA-exploración 9	30	DQRCDAACNSPG
AA-exploración 10	31	QRCDRAAANSPGC
AA-exploración 11	32	RCDREAAASPGCG
AA-exploración 12	33	CDRECAAPGCGW
AA-exploración 13	34	DRECNAAAGCGWD
AA-exploración 14	35	RECNSAACGWDG
AA-exploración 15	36	ECNSPAAAGWDGG
AA-exploración 16	37	CNSPGAAWDGGD