

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 184**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/33 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 33/24 (2009.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2016** **PCT/JP2016/061961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16167306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2016** **E 16780097 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020** **EP 3284752**

54 Título: **Anticuerpo anti-Notch 4 humano**

30 Prioridad:

16.04.2015 US 201562148253 P

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

09.04.2021

73 Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es:

SAKAMOTO, YOSHIMASA;
ADACHI, YUSUKE;
MATSUI, JUNJI;
KATO, YU;
OZAWA, YOICHI;
ABE, TAKANORI;
ITO, KEN;
NAKAZAWA, YUYA;
TACHINO, SHO;
SUZUKI, KATSUHISA;
AGARWALA, KISHAN;
HOSHINO, KANA y
KATAYAMA, MASAHIKO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 818 184 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

Anticuerpo anti-Notch 4 humano

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a Notch4 humano.

10 **Antecedentes de la técnica**

Notch es una molécula que contribuye en la determinación del destino de las células de varios tejidos y se indica que participa, por ejemplo, en la diferenciación, proliferación y supervivencia durante cada uno de los estadios del estadio inicial de desarrollo, estadio embrionario y después del nacimiento. Se describen cuatro tipos de receptores, que incluyen Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4, así como cinco tipos de ligandos, que incluyen Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL3 y DLL4, como la familia Notch. Cuando un receptor Notch expresado en una célula adyacente se une a un ligando de Notch, el dominio NRR presente en el dominio extracelular inferior del receptor es escindido por parte de TACE y, debido al cambio estructural del dominio intracelular provocado de este modo, el dominio intracelular es escindido por la secretasa γ. El dominio intracelular de Notch (NIC) formado como resultado migra hacia el núcleo, forma un heterodímero con el factor de transcripción CSL y se inducen y expresan moléculas diana tales como la familia aHes o la familia Hey. Estas moléculas de estadios posteriores inducen y expresan a su vez varios genes y, como resultado, la señal de Notch contribuye, por ejemplo, al mantenimiento de células madre o células progenitoras, la diferenciación, la detención del ciclo celular y la determinación del destino de las células (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 1).

También existe constancia de que Notch participa en la formación de tumores. En primer lugar, se ha descrito que la mutación de Notch1 debida a la traslocación cromosómica t(7;9) se relaciona con el inicio de la leucemia linfoblástica aguda de pre-linfocitos (T-ALL). Además, se ha descrito que el sitio de inserción en el genoma del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), que es un modelo de inicio de tumor espontáneo, es Int3 (dominio intracelular de Notch4) y se ha descrito que se induce cáncer de células epiteliales, tal como cáncer de mama o cáncer de glándulas salivales, en un ratón transgénico en el que se ha expresado Int3 de forma forzada (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 2). También se ha descrito que Notch4 se relaciona con la oncogénesis, evolución o metástasis del cáncer de mama (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 3), melanoma (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 4), cáncer de estómago (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 5), leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (B-ALL) (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 6), leucemia linfocítica crónica (CLL) (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 7), glioma (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 8), carcinoma hepatocelular (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 9), cáncer pulmonar (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 10), cáncer renal (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 11), sarcoma de Kaposi (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 12) y similares en seres humanos.

La señal de Notch también contribuye a la neovascularización intratumoral. Notch1 y Notch4 se expresan como receptores Notch en células endoteliales vasculares y la expresión de DLL4 y Jagged1 se confirma como ligandos. Las células endoteliales activadas (*tip cells*) presentes en el extremo de los nuevos vasos sanguíneos expresan en gran medida DLL4 con estimulación de VEGF y los vasos sanguíneos se extienden enviando una señal al receptor Notch de la célula del tallo adyacente. Por otro lado, Jagged1 compite con DLL4 por el receptor Notch e inhibe la unión de DLL4 con el receptor Notch. Debido a que la señal de Jagged1 es débil en comparación con la de DLL4, la señal de Notch se suprime mediante la unión con Jagged1. La intensidad de la señal de Notch se ajusta mediante los patrones de expresión que difieren espacialmente de estos dos ligandos para controlar la neovascularización (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 13).

Se ha descrito la producción de un anticuerpo inhibidor de DLL4, donde cuando la señal procedente de DLL4 es inhibida con un anticuerpo inhibidor de DLL4, se potencia la angiogénesis inmadura sin torrente sanguíneo dentro de un tumor y se induce la inhibición de la proliferación tumoral. Esto es un fenómeno completamente diferente al caso en el que un inhibidor de VEGF inhibe la proliferación de células endoteliales vasculares para suprimir la angiogénesis, y la señal de Notch está ganando atención como diana novedosa para inhibidores de la neovascularización (Referencia de la bibliografía distinta de patentes 14).

El documento US 2011/0033481 describe que la vía de Notch, especialmente Notch 4, representa una vía central en la carcinogénesis. Se describen composiciones de células madre de tumores sólidos, métodos para distinguir poblaciones funcionalmente diferentes de células tumorales, métodos para utilizar estas poblaciones de células tumorales para estudiar los efectos de agentes terapéuticos sobre el crecimiento tumoral, y métodos para identificar y evaluar terapias novedosas contra el cáncer dirigidas a las células madre de tumores sólidos.

60 **Lista de citas**

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 1] Radtke *et al.* (2004), *Nature Immunology* 5,247-53.

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 2] Jhappan *et al.* (1992), *Genes Dev.* 6,345-55

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 3] Nagamatsu *et al.* (2014), *Anticancer Res.* 34, 69-80

5 [Referencia de la bibliografía distinta de patentes 4] Hardy *et al.* (2010), *Cancer Res.* 70, 10340-50

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 5] Qian *et al.* (2015), *Mol Cell Biochem.* 401, 165-74

10 [Referencia de la bibliografía distinta de patentes 6] Nwabo Kamdje *et al.* (2011), *Blood* 118, 380-9

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 7] Nwabo Kamdje *et al.* (2012), *Blood Cancer Journal* 2, e73

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 8] Dell'Albani *et al.* (2012), *Neuro-Oncology* 16, 204-16

15 [Referencia de la bibliografía distinta de patentes 9] Ahn *et al.* (2013), *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 12, 286-94

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 10] Justilien *et al.* (2012), *PLoS ONE* 7, e35040

20 [Referencia de la bibliografía distinta de patentes 11] Boo *et al.* (2009), *J Pediatr Surg.* 44, 2031-6

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 12] Curry *et al.* (2005), *Oncogene* 24, 6333-44

[Referencia de la bibliografía distinta de patentes 13] Benedito *et al.* (2009), *Cell* 137, 1124-35

25 [Referencia de la bibliografía distinta de patentes 14] Ridgway *et al.* (2006), *Nature* 444, 1083-7

Compendio de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

30 El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un anticuerpo anti-Notch4 humano o un fragmento de unión a Notch4 de este que pueda tener actividad neutralizante frente a Notch4 humano, así como también una composición farmacéutica que comprende el mismo como principio activo.

Medios para resolver los problemas

35 Como resultado de una investigación exhaustiva dirigida a resolver los problemas anteriores, los inventores de la presente han sido capaces de obtener un anticuerpo anti-Notch4 humano de ratón que tiene una elevada actividad neutralizante y afinidad de unión frente a Notch4 humano. Además, al determinar la secuencia de la región determinante de la complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo anti-Notch4 humano de ratón, los inventores de la presente han hecho posible la producción de un anticuerpo humanizado que comprende la región variable de las cadenas ligera y pesada así como la secuencia de CDR de dicho anticuerpo anti-Notch 4 humano de ratón para completar la presente invención.

45 Dicho de otro modo, la presente divulgación se refiere a lo siguiente.

(1) Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este que comprende:

50 (a) una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 15 o 16;

(b) una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 17 o 18;

(c) una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 19;

55 (d) una CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 20;

(e) una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 21; y

60 (f) una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 22.

(2) El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (1), donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras y se selecciona entre cualquiera de los siguientes (i) - (vii):

- [illegible]

(11) El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (10), donde la región constante de la cadena pesada comprende la región constante de IgG humana.

5 (12) El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (11), donde dicha región constante de IgG humana es la región constante de IgG2 humana.

(13) El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (12), donde dicha región constante de IgG2 humana tiene una mutación V234A y/o G237A.

10 (14) El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (10), donde el residuo de lisina en el extremo carboxi de la región constante de dicha cadena pesada se elimina de forma artificial.

15 (15) El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (10), donde la región constante de dicha cadena ligera comprende la región constante de IgK humana.

(16) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch de este de acuerdo con cualquiera de (1) - (15).

20 (17) La composición farmacéutica de acuerdo con (16) que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

(18) La composición farmacéutica de acuerdo con (17) que se utiliza para el tratamiento de cáncer pulmonar no microcítico.

25 (19) La composición farmacéutica de acuerdo con (17) que se utiliza para el tratamiento de cáncer de tiroides.

(20) La composición farmacéutica de acuerdo con (17) que se utiliza para el tratamiento de cáncer de próstata.

30 (21) La composición farmacéutica de acuerdo con (17) que se utiliza para el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

La presente invención se refiere a las siguientes invenciones.

35 (1') Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras y se selecciona entre cualquiera de los siguientes (i) - (vii):

40 (i) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45,

45 (ii) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45,

(iii) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47,

50 (iv) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 49,

55 (v) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 51,

60 (vi) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 39 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45, y

(vii) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.

65

(2') El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (1'), donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.

(3') El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (1'), donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.

(4') El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (1'), donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.

(5') El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (1'), donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 49.

(6') El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (1'), donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 51.

(7') El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (1'), donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 39 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.

(8') El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (1'), donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.

(9') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de (1') - (8'), donde la región constante de dicha cadena pesada y la región constante de dicha cadena ligera comprenden la región constante de un anticuerpo humano.

(10') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (9'), donde la región constante de la cadena pesada comprende la región constante de IgG humana.

(11') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (10'), donde dicha región constante de IgG humana es la región constante de IgG2 humana.

(12') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (11'), donde dicha región constante de IgG2 humana tiene una mutación V234A y/o G237A.

(13') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de (9') a (12'), donde el residuo de lisina en el extremo carboxi de la región constante de dicha cadena pesada se elimina de forma artificial.

(14') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de (9') a (13'), donde la región constante de dicha cadena ligera comprende la región constante de IgK humana.

(15') Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de (1') - (14').

(16') La composición farmacéutica de acuerdo con (15') que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

(17') La composición farmacéutica de acuerdo con (16') para su uso en el tratamiento de cáncer pulmonar no microcítico.

(18') La composición farmacéutica de acuerdo con (16') para su uso en el tratamiento de cáncer de tiroides.

(19') La composición farmacéutica de acuerdo con (16') para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata.

(20') La composición farmacéutica de acuerdo con (16') para su uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere además a las siguientes invenciones.

(1'') Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.

(2'') Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.

(3'') Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.

(4'') Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 49.

(5'') Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 51.

(6'') Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 39 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.

(7'') Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras, y la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.

(8'') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de (1'') - (7''), donde la región constante de dicha cadena pesada y la región constante de dicha cadena ligera comprenden la región constante de un anticuerpo humano.

(9'') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (8''), donde la región constante de la cadena pesada comprende la región constante de IgG humana.

(10'') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (9''), donde dicha región constante de IgG humana es la región constante de IgG2 humana.

(11'') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con (10''), donde dicha región constante de IgG2 humana tiene una mutación V234A y/o G237A.

(12'') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de (8'') a (11''), donde el residuo de lisina en el extremo carboxi de la región constante de dicha cadena pesada se elimina de forma artificial.

(13'') El anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de (8'') a (12''), donde la región constante de dicha cadena ligera comprende la región constante de IgK humana.

(14'') Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de (1'') - (13'').

(15'') La composición farmacéutica de acuerdo con (14'') que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

(16") La composición farmacéutica de acuerdo con (15") para su uso en el tratamiento de cáncer pulmonar no microcítico.

(17") La composición farmacéutica de acuerdo con (15") para su uso en el tratamiento de cáncer de tiroides.

(18") La composición farmacéutica de acuerdo con (15") para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata.

(19") La composición farmacéutica de acuerdo con (15") para su uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la correlación entre la concentración de Anticuerpo B y el valor de luminiscencia relativa (%).

La Figura 2 muestra el efecto antitumoral y el efecto supresor de la perfusión sanguínea del Anticuerpo B en un modelo de xenoinjerto Calu6. La Figura 2A muestra el cambio en el volumen tumoral relativo (RTV) para cada grupo con la administración en la vena de la cola de IgG con una dosis de 10 mg/kg para el Control o de Anticuerpo B con una dosis de 1, 3 o 10 mg/kg en un modelo de xenoinjerto Calu6 (N = 8, media $\pm$ error estándar). La Figura 2B muestra el resultado de la determinación del área de fluorescencia de Hoechst para tumores muestreados al final de la prueba de administración (Día 8) (N = 8 media $\pm$ error estándar) (* P < 0.05 frente al grupo de administración de IgG de Control (prueba de Dunnett)).

La Figura 3 muestra el efecto antitumoral debido al uso combinado de Anticuerpo B y cisplatino en un modelo de trasplante subcutáneo de ratón Calu6. El cambio en el volumen tumoral relativo (RTV) del grupo de control (no tratado), el grupo de administración de Anticuerpo B (administración en la vena de la cola dos veces a la semana), el grupo de administración de cisplatino (administración en la vena de la cola una vez) y el grupo de combinación de Anticuerpo B (administración en la vena de la cola dos veces a la semana) + cisplatino (administración en la vena de la cola una vez) (N = 4, media $\pm$ error estándar) (*: P < 0.05 frente al grupo de control (prueba t de Student, Día 8, Día 24), #: P < 0.05 grupo de administración de 10 mg/kg de cisplatino frente al grupo de combinación de Anticuerpo B + cisplatino (prueba t de Student, Día 36)).

La Figura 4 muestra el efecto antitumoral debido al uso combinado de Anticuerpo B y mesilato de lenvatinib en un modelo de xenoinjerto de la línea celular de cáncer de tiroides humana FTC238. El cambio en el volumen tumoral relativo (RTV) (N = 5, media $\pm$ error estándar) del grupo de control (no tratado), el grupo de administración de Anticuerpo B (administración en la vena de la cola dos veces a la semana), el grupo de administración de mesilato de lenvatinib (administración oral una vez al día) y el grupo de combinación de Anticuerpo B (administración en la vena de la cola dos veces a la semana) + mesilato de lenvatinib (administración oral una vez al día) (*: P < 0.05 frente al grupo de control (prueba t de Student, Día 13), #: P < 0.05 grupo de administración de un solo agente frente al grupo de combinación de Anticuerpo B + mesilato de lenvatinib (prueba t de Student, Día 13)).

La Figura 5 muestra el efecto antitumoral debido al uso combinado de Anticuerpo B y paclitaxel en un modelo de xenoinjerto de la línea celular de cáncer de próstata humana DU145. El cambio en el volumen tumoral (TV) del grupo de control (no tratado), el grupo de administración de Anticuerpo B (administración en la vena de la cola dos veces a la semana), el grupo de administración de paclitaxel (administración en la vena de la cola una vez al día durante 5 días) y el grupo de combinación de Anticuerpo B (administración en la vena de la cola dos veces a la semana) + paclitaxel (administración en la vena de la cola una vez al día durante 5 días) (N = 4, media $\pm$ error estándar) (*: P < 0.05 frente al grupo de control (prueba t de Student, Día 57)), #: P < 0.05 grupo de administración de un solo agente frente al grupo de combinación de Anticuerpo B + paclitaxel (prueba t de Student, Día 57).

La Figura 6 muestra el efecto antitumoral debido al uso combinado de Anticuerpo B y mesilato de lenvatinib en un modelo de xenoinjerto de carcinoma hepatocelular derivado de un paciente humano. El cambio en el volumen del tumor (TV) del grupo de control (HCl 3 mM), el grupo de mesilato de lenvatinib (10 mg/kg), el grupo de tosilato de sorafenib (30 mg/kg) y el grupo de mesilato de lenvatinib (10 mg/kg) más Anticuerpo B (0.5 mg/ratón) (N= 10, media $\pm$ error estándar) (*: P < 0.05 frente al grupo de control, prueba t no apareada, Día 13).

La Figura 7 muestra la correlación entre la concentración de Anticuerpo B y el valor de luminiscencia relativa (%). La gráfica muestra el valor promedio de los resultados de tres pruebas independientes y la barra de error muestra la desviación estándar de estos.

La Figura 8 muestra el sensograma superpuesto de la interacción entre los dominios NRR de Notch humano y el Anticuerpo B. (A) Notch1 humano-NRR-SEAP-His, (B) Notch2 humano-NRR-SEAP-His, (C) Notch3 humano-NRR-SEAP-His y (D) Notch4 humano-NRR-SEAP-His.

Descripción de las realizaciones

En la presente, un anticuerpo se puede referir a una molécula de inmunoglobulina que se puede unir específicamente a una diana tal como un azúcar, un polinucleótido, un lípido, un polipéptido y una proteína mediante al menos un sitio

de reconocimiento de antígenos situado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Un anticuerpo se puede referir a un anticuerpo monoclonal o policlonal completo.

El anticuerpo puede ser de cualquier clase tal como IgG, IgA o IgM (o una subclase de estos), etc. y no se limita a ninguna clase particular. Una inmunoglobulina se clasifica en diferentes clases dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo (que se denomina en ocasiones cadena H). Existen cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, algunas de las cuales se pueden clasificar adicionalmente en subclases (isotipos) tales como IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Las regiones constantes de la cadena pesada correspondientes a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Además, los tipos de cadena ligera (que se denomina en ocasiones cadena L) del anticuerpo incluyen las cadenas λ y κ .

En un aspecto, el anticuerpo anti-Notch4 humano de la presente invención puede ser un anticuerpo de tipo IgG, por ejemplo, un anticuerpo de tipo IgG₁ o un anticuerpo de tipo IgG₂, etc. Además, en algunos casos, el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este puede adoptar la forma de un monómero, un dímero o un multímero.

El fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente no está particularmente limitado, siempre que sea un fragmento estructural y funcional de dicho anticuerpo y conserve la capacidad de unión a un antígeno al que se pueda unir dicho anticuerpo. Los ejemplos del fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen, sin carácter limitante, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, de cadena única (ScFv), variantes de estos, una proteína de fusión que comprenda una porción de anticuerpo, otras estructuras modificadas de una molécula de inmunoglobulina que comprendan el sitio de reconocimiento del antígeno, y similares.

El fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo se puede obtener, por ejemplo, mediante la digestión proteolítica de un anticuerpo completo, o puede ser producido directamente por una célula hospedadora recombinante (por ejemplo, un eucariota tal como una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero, o un procariota tal como *E. coli*). Por ejemplo, un fragmento F(ab')₂ se puede formar recolectando fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y sometiendo a una unión química. También se puede formar F(ab')₂ utilizando una cremallera de leucina GCN4 que propicia el acoplamiento de una molécula F(ab')₂. Además, se puede utilizar un sintetizador automático a la hora de producir scFv con una tecnología de síntesis química. Se puede introducir un plásmido adecuado que comprenda un polinucleótido que codifique scFv en una célula hospedadora adecuada (por ejemplo, un eucariota tal como una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero, o un procariota tal como *E. Coli*) cuando se produce ScFv con una tecnología de recombinación genética. El polinucleótido que codifica el scFv de interés se puede producir mediante una manipulación muy conocida tal como la ligación de polinucleótidos. El scFv producido como resultado se puede aislar utilizando una tecnología de purificación de proteínas estándar muy conocida en la técnica.

La región variable de un anticuerpo se puede referir a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo y/o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, y la región constante de un anticuerpo se puede referir a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo y/o la región constante de la cadena pesada del anticuerpo. La región variable de las cadenas ligera y pesada está constituida cada una por cuatro regiones de entramado (FR) unidas mediante tres CDR conocidas también como regiones hipervariables. La CDR en cada cadena se mantiene próxima mediante una FR y, junto con la CDR en la otra cadena, contribuye a la formación del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Las tecnologías para determinar CDR incluyen, sin carácter limitante, por ejemplo, (1) una estrategia basada en la variabilidad de las secuencias entre diferentes especies (tal como Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD); y (2) una estrategia basada en la investigación de la estructura cristalina de complejos de antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.*, 1997 *J. Molec. Biol.* 273:927-948). Estas y otras estrategias se pueden utilizar combinadas.

La expresión «se une específicamente a» es una expresión muy conocida en el campo de los expertos en la técnica y los métodos para determinar la unión específica de un anticuerpo, etc. a un antígeno o un epítipo también son muy conocidos. Por ejemplo, se sobreentiende que un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al epítipo de Notch4 se puede unir a dicho epítipo de Notch4 con una actividad de unión y afinidad más elevadas, de forma más rápida y/o durante una duración más prolongada que a otro epítipo o sitios que no sean epítopos. Sin embargo, no se excluye que un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a una primera diana se una específicamente a una segunda diana.

Un anticuerpo monoclonal se puede referir a un anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente uniformes. Dicho de otro modo, los anticuerpos individuales contenidos en esta población son idénticos excepto por una ligera cantidad de mutantes que existen de forma natural, los cuales pueden estar presentes. Los anticuerpos monoclonales se dirigen a un único sitio del antígeno y son muy específicos. Además, al contrario de un anticuerpo policlonal habitual que tiene como diana diferentes antígenos o diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal tiene como diana un único epítipo del antígeno. El modificador «monoclonal» indica la propiedad de un anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente uniforme y no se debe interpretar como que se limite al hecho de requerir que la producción del anticuerpo sea mediante un método particular.

El anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de mamífero no humano (tal como de ratón, rata, conejo, vaca, caballo y cabra) o un fragmento de unión al antígeno de estos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que se ha introducido, por ejemplo, la región variable de un anticuerpo no humano (tal como de ratón o rata) en la región constante de un anticuerpo humano y se puede referir, por ejemplo, a un anticuerpo en el que la región variable deriva de un anticuerpo no humano y la región constante deriva de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo en el que se ha introducido, por ejemplo, la región hipervariable (que también se denomina región determinante de la complementariedad (CDR)) de un anticuerpo no humano en un anticuerpo humano y se puede referir, por ejemplo, a un anticuerpo en el que la CDR deriva de un anticuerpo no humano y otras regiones del anticuerpo derivan de un anticuerpo humano. Cabe destacar que, en la presente invención, la frontera entre un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado no tiene por qué estar necesariamente bien definida y un anticuerpo se puede encontrar en un estado tal que se pueda denominar tanto anticuerpo quimérico como anticuerpo humanizado.

Obviamente, el anticuerpo quimérico o humanizado ilustrado anteriormente que ha sido modificado adecuadamente (tal como mediante la modificación del anticuerpo o la sustitución, adición o delección parcial de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo) a la vez que se mantiene la función de dicho anticuerpo (o con el fin de añadir o mejorar la función de dicho anticuerpo) también se engloba en el anticuerpo de la presente divulgación. Más específicamente, en el alcance de la presente divulgación también se engloba un anticuerpo modificado mediante la tecnología POTELLIGENT™ con el fin de incrementar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad (ADCC)) del anticuerpo unido a la diana, un anticuerpo modificado mediante la tecnología COMPLEGENT™ con el fin de incrementar la citotoxicidad dependiente del complemento (actividad (CDC)) del anticuerpo o un anticuerpo modificado mediante el uso combinado de estas tecnologías. Además, en el alcance de la presente divulgación también se engloba un anticuerpo en el que se ha eliminado la lisina (Lys) situada en el extremo carboxi (C terminal) de la cadena pesada mediante un método artificial tal como una modificación genética con el fin de reducir la falta de uniformidad de los anticuerpos producidos mediante células productoras de anticuerpos. Además, en el alcance de la presente divulgación también se engloba un anticuerpo biespecífico que posee un sitio de unión del anticuerpo que tiene la secuencia de CDR del anticuerpo de la presente invención junto con un sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno diferente (Kontermann (2012), mAbs 4, 182-97).

El anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este se puede modificar según se desee. La modificación del anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este puede ser una modificación que cambie (a) la estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos en la región modificada tal como la conformación de lámina o hélice; (b) la carga o estado de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) el efecto de la modificación en el volumen de la cadena lateral, o una modificación en la que estos cambios no se observen claramente.

La modificación del anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este se puede conseguir, por ejemplo, mediante sustitución, delección y adición, etc. de los residuos aminoacídicos que lo constituyen.

En la presente, un aminoácido se emplea en su significado más amplio e incluye, no solo los aminoácidos naturales tales como serina (Ser), asparagina (Asn), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), alanina (Ala), tirosina (Tyr), glicina (Gly), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y prolina (Pro), sino también aminoácidos no naturales tales como derivados y variantes de aminoácidos. Los expertos en la técnica reconocerán naturalmente, teniendo en cuenta esta definición amplia, que los ejemplos de aminoácidos de la presente incluyen aminoácidos L; aminoácidos D; aminoácidos modificados químicamente tales como derivados y variantes de aminoácidos; aminoácidos que no son materiales que configuran proteínas *in vivo* tales como norleucina, β-alanina y ornitina; y compuestos que se sintetizan químicamente los cuales tienen propiedades de aminoácidos muy conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de un aminoácido no natural incluyen α-metilaminoácidos (tales como α-metilalanina), aminoácidos D (tales como ácido aspártico D y ácido glutámico D), aminoácidos similares a la histidina (tales como 2-aminohistidina, β-hidroxihistidina, homohistidina, α-fluorometilhistidina y α-metilhistidina), aminoácidos que tienen metileno en exceso en la cadena lateral («homo»aminoácidos) y aminoácidos donde el aminoácido con un grupo funcional de tipo carboxilato en la cadena lateral está sustituido con un grupo de tipo sulfonato (tal como el ácido cisteico).

Los residuos aminoacídicos de origen natural se pueden clasificar, por ejemplo, en los siguientes grupos basándose en las propiedades de las cadenas laterales comunes:

(1) Hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu e Ile;

(2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser y Thr;

(3) Ácidos: Asp y Glu;

(4) Básico: Asn, Gln, His, Lys y Arg;

(5) Residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly y Pro; y

(6) Aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

Una sustitución no conservativa de la secuencia de aminoácidos que configura un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este se puede llevar a cabo intercambiando un aminoácido que pertenezca a uno de estos grupos por un aminoácido que pertenezca a otro grupo. Una sustitución más conservativa se puede llevar a cabo intercambiando un aminoácido que pertenezca a uno de estos grupos por otro aminoácido que pertenezca al mismo grupo. De forma similar, se puede llevar a cabo de forma adecuada una delección o sustitución de la secuencia de aminoácidos.

Una modificación del aminoácido que configura un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este puede ser, por ejemplo, una modificación posterior a la traducción tal como una glicosilación por parte de un azúcar, una acetilación o una fosforilación. El anticuerpo se puede glicosilar en una posición conservada en su región constante. La glicosilación de un anticuerpo se lleva a cabo habitualmente mediante una unión a través de N o una unión a través de O. Una unión a través de N se refiere a la unión de un resto de azúcar a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína (donde X es cualquier aminoácido distinto de prolina) son secuencias de reconocimiento para añadir enzimáticamente un resto de azúcar a la cadena lateral de la asparagina. Existe un sitio de glicosilación potencial presente cuando una de estas secuencias tripeptídicas está presente en un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este. Una glicosilación con unión a través de O puede ser la unión de N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido (tal como serina o treonina) y, en algunos casos, puede ser la unión a 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Las condiciones de glicosilación (por ejemplo, cuando la glicosilación se lleva a cabo con un medio biológico, el tipo de célula hospedadora o medio celular, pH y similares) pueden ser seleccionadas adecuadamente por los expertos en la técnica de acuerdo con el objetivo.

El anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este se puede modificar adicionalmente basándose en el sentido común técnico con el que estarán familiarizados los expertos en la técnica mediante otros métodos de modificación solos o combinados.

El anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este se puede producir mediante un método con el que estarán familiarizados los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo se puede producir con un hibridoma que produzca el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este, o integrando el gen que codifica el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este en un vector de expresión e introduciendo dicho vector de expresión, por ejemplo, en células de *E. Coli*, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO) y similares.

El anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este pueden ser los que se aíslan o purifican de acuerdo con métodos muy conocidos por los expertos en la técnica. En la presente, «aislado» o «purificado» se refiere a que se ha aislado o purificado artificialmente a partir del estado natural. Cuando una molécula o una composición es de origen natural, está «aislada» o «purificada» cuando se ha modificado o retirado de su entorno original o ambos. Los ejemplos de un método de aislamiento o purificación incluyen, sin carácter limitante, electroforesis, medios de biología molecular, inmunológicos o cromatográficos, específicamente, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba o cromatografía de HPLC de fase inversa, o enfoque isoeléctrico.

El método empleado para medir la propiedad de unión (tal como afinidad de unión y reactividad cruzada) de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este respecto a un antígeno puede ser un método muy conocido en el campo por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión se puede medir con, sin carácter limitante, un biosensor Biacore™, biosensor KinExA, ensayo de proximidad por centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (de IGEN), citometría de flujo, desactivación de fluorescencia, transferencia de fluorescencia, presentación de levaduras y/o inmunotinción. La actividad neutralizante de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este frente a la unión de Notch4 con su ligando se puede medir con, sin carácter limitante, un biosensor Biacore™, ELISA, y/o citometría de flujo. La actividad neutralizante de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este frente a la transducción de señales que es inducida dentro del cuerpo humano debido a la unión de Notch4 con su ligando, o frente a la respuesta de expresión molecular o el cambio de funcionalidad de la célula se puede medir con, sin carácter limitante, por ejemplo, los siguientes métodos: (i) un ensayo marcador que detecta la variación en la expresión de una molécula en una etapa posterior respecto a la señal de Notch, (ii) inmunotransferencia de Western que detecta la escisión de Notch4 por parte de la enzima que convierte TNF- α (TACE) o γ selectasa, (iii) tinción de células inmunitarias que detecta el importe nuclear del dominio intracelular de Notch (NIC) y (iv) evaluación de la funcionalidad celular que emplea una célula normal tal como una célula endotelial vascular o una célula cancerosa que expresa Notch4.

En un aspecto, la presente invención puede ser una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este.

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este en una forma de preparado acuosa o seca puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o un estabilizante. Los ejemplos de un portador aceptable, excipiente o un estabilizante incluyen solución salina; un tampón tal como ácido fosfórico, ácido cítrico y otros ácidos orgánicos; un antioxidante, incluido el ácido ascórbico; un polipéptido de peso molecular bajo; una proteína (tal como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulina); un polímero hidrófilo tal como polivinilpirrolidona; un aminoácido; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; un agente quelante tal como EDTA; alditos tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman una sal tales como sodio; o un surfactante no iónico tal como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este se puede encapsular, por ejemplo, en una microcápsula, en un sistema de suministro farmacológico coloidal (tal como un liposoma, una microesfera de albúmina, una microemulsión, una nanopartícula o una nanocápsula) o en una macroemulsión. Cuando se desea una administración de liberación sostenida del anticuerpo en un preparado que tenga una propiedad de liberación adecuada para cualquier enfermedad que requiera la administración del anticuerpo, se puede diseñar una microencapsulación del anticuerpo. Los ejemplos de una matriz de liberación sostenida incluyen un poliéster, un hidrogel (tal como poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico)), ácidos polilácticos, un copolímero de ácido L-glutámico y γ -L-glutamato de etilo, uno de etileno-acetato de vinilo no degradable, un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico degradable tal como LUPRON DEPOT™ (una microesfera inyectable compuesta de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Un preparado empleado para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se puede conseguir fácilmente mediante una filtración a través de una membrana de filtración estéril.

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este tiene el potencial de ser útil para el tratamiento de cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de tiroides, cáncer de próstata o carcinoma hepatocelular. Dicho de otro modo, otro aspecto de la presente divulgación puede ser un método para tratar cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de tiroides, cáncer de próstata o carcinoma hepatocelular que comprende un paso de administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este. Además, otro aspecto de la presente invención puede ser el uso del anticuerpo anti-Notch4 de la presente divulgación o un fragmento de unión al antígeno de este para la elaboración de un fármaco terapéutico para el cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de tiroides, cáncer de próstata o carcinoma hepatocelular.

El anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este utilizado para el tratamiento de cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de tiroides, cáncer de próstata o carcinoma hepatocelular es preferentemente un anticuerpo que reconoce el dominio extracelular de Notch4. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a cualquier sitio de las posiciones 24 - 1447 en la secuencia de aminoácidos de Notch4 humano que se muestra en SEQ ID NO. 1. En la secuencia de aminoácidos de Notch4 humano que se muestra en SEQ ID NO. 1, las posiciones 1 - 23 son la secuencia señal y las posiciones 1448 - 2003 son el dominio de transmembrana y el dominio intracelular.

El anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este se puede utilizar en un método terapéutico solo o combinado con otros agentes o composiciones. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este se puede administrar a la vez o en momentos diferentes con otro agente anticancerígeno. Una terapia combinada de este tipo comprende la administración combinada (dos o más agentes se contienen en el mismo preparado o un preparado por separado) y la administración por separado (por ejemplo, a la vez o de forma continuada). Cuando dos o más agentes se administran por separado, la administración del anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este se puede realizar antes o después del método terapéutico que la acompaña. El agente anticancerígeno que se puede utilizar combinado con el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este puede ser, por ejemplo, un agente anticancerígeno que sea eficaz para tratar el cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de tiroides, cáncer de próstata o carcinoma hepatocelular. Los ejemplos de un agente anticancerígeno de este tipo pueden incluir, sin carácter limitante, cisplatino, lenvatinib y paclitaxel. Los ejemplos de la composición farmacéutica para una terapia combinada de este tipo pueden incluir, sin carácter limitante, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este y cisplatino, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este y lenvatinib, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este y paclitaxel.

El sujeto para la administración de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este no está limitado y la presente divulgación se puede

emplear para un mamífero (tal como un ser humano, un cerdo, una vaca, un mono, un mandril, un perro, un gato, una rata y un ratón). Sin embargo, los seres humanos se pueden excluir del sujeto cuando no se prefiera este caso.

El método de administración de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno de este a un sujeto (tal como la vía de administración, dosis, frecuencia de administración al día y programa de administración) no está limitado y puede ser determinado convenientemente por los expertos en la técnica (tales como un médico) de acuerdo con el estado de salud del sujeto, el grado de la enfermedad, el tipo de agente utilizado en la combinación y similares.

Los expertos en la técnica reconocen que, siempre que no sea contradictorio desde un punto de vista técnico, uno cualquiera o más de todos y cada uno de los aspectos descritos en la presente se pueden combinar adecuadamente para llevar a cabo la presente invención. Además, los expertos en la técnica reconocen que, siempre que no sea contradictorio desde un punto de vista técnico, se prefiere que todos y cada uno de los aspectos preferidos o convenientes descritos en la presente se combinen adecuadamente para llevar a cabo la presente invención.

Las referencias de la bibliografía citadas en la presente se proporcionan únicamente con el fin de divulgar la tecnología relacionada precedente a la fecha de presentación de la presente solicitud y no se deben interpretar como una admisión de que los inventores de la presente no poseen el derecho de prioridad respecto a dichas divulgaciones por motivos de invención previa o cualquier otro motivo. Toda descripción de estas referencias de la bibliografía se basa en la información disponible para los solicitantes de la presente y no configura el reconocimiento de que estas descripciones sean correctas.

Los términos utilizados en la presente se emplean para describir realizaciones particulares y no se pretende que limiten la invención.

El término «comprende», tal como se utiliza en la presente, a menos que el contenido indique claramente que se debe interpretar de otra manera, se refiere a la presencia de los artículos descritos (tales como componentes, pasos, elementos o números) y no excluye la presencia de otros artículos (tales como componentes, pasos, elementos o números). La expresión «constituido por» engloba los aspectos descritos con las expresiones «constituido por» y/o «constituido esencialmente por».

La expresión «actividad neutralizante», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la actividad para inhibir la unión de Notch4 con su ligando y/o la actividad para inhibir la transducción de señales que es inducida dentro del cuerpo humano por la unión de Notch4 con su ligando, o la respuesta de expresión molecular o cambio de funcionalidad de la célula.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos utilizados en la presente (incluidos los términos técnicos y científicos) tienen los mismos significados que los que reconocen por lo general los expertos en la materia de la tecnología a la que pertenece la presente invención. Los términos utilizados en la presente, a menos que se defina explícitamente lo contrario, se deben interpretar como que tienen los significados que son coherentes con los significados de la presente y de los campos técnicos relacionados, y no se deben interpretar como que tienen significados idealizados o excesivamente formales.

Términos tales como primero y segundo se emplean para expresar varios elementos y se reconoce que estos elementos no deben estar limitados por estos términos en sí. Estos términos se emplean únicamente con el fin de discriminar un elemento de otro y es posible, por ejemplo, describir un primer elemento como un segundo elemento y, de forma similar, describir un segundo elemento como un primer elemento sin alejarse del alcance de la presente invención.

Los valores numéricos empleados en la presente para indicar el intervalo de valores numéricos o el contenido de un componente y similares, a menos que se indique explícitamente, se deben interpretar como que están modificados por el término «aproximadamente». Por ejemplo, a menos que se indique explícitamente, se reconoce que «4 °C» significa «aproximadamente 4 °C» y los expertos en la técnica pueden reconocer de forma razonable naturalmente el grado de esto de acuerdo con el sentido común técnico y el contexto de la presente memoria descriptiva.

A menos que se indique claramente que significa otra cosa en el contexto, cuando se utilice en la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la presente, se debe reconocer que cada aspecto representado en forma singular también puede ser una forma plural siempre que no se contradiga técnicamente, y viceversa.

A continuación, la presente invención se describirá más detalladamente haciendo referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención puede estar representada por varios aspectos y no se debe interpretar que esté limitada a los Ejemplos que se describen en la presente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de un anticuerpo monoclonal anti-Notch4 humano

Producción de un anticuerpo monoclonal anti-Notch4 humano de ratón

Con el fin de producir un anticuerpo monoclonal frente a Notch4 humano (N.º de acceso a Genbank NP_004548.3) (SEQ ID NO. 1), se inmunizaron ratones Balb/c con tres repeticiones de EGF y la región reguladora negativa (NRR) de Notch4 humano (posiciones 1046 - 1445 de SEQ ID NO. 1) fusionada con fosfatasa alcalina secretora (SEAP) y una marca de histidina (se denomina en lo sucesivo en la presente «Notch4 humano 3EGF-NRR-SEAP-His»).

La proteína Notch4 humano 3EGF-NRR-SEAP-His se preparó mediante los siguientes pasos: En primer lugar, se construyó un vector de expresión pcDNA3.1-Notch4 humano 3EGF-NRR-SEAP-His. Las tres repeticiones de EGF y NRR de Notch4 humano se amplificaron mediante PCR y se subclonaron en el sitio SfiI/NotI de pcDNA3.1 (Invitrogen/LifeTechnologies) que tenía una secuencia de ADN que codificaba una secuencia señal de IgK, SEAP, y una marca de histidina. A continuación, el vector de expresión pcDNA3.1-Notch4 humano 3EGF-NRR-SEAP-His se transfeció en células HEK293 EBNA (Invitrogen/LifeTechnologies) con TransIT-LT1 (TAKARA). Después de 6 días de incubación (5% de CO₂, 37 °C), se recolectó el sobrenadante del cultivo. La proteína Notch4 humano 3EGF-NRR-SEAP-His se purificó con una columna Protino (MACHEREY-NAGEL).

Se mezclaron veinte microgramos de dicha proteína Notch4 humano 3EGF-NRR-SEAP-His con la misma cantidad de adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik GmbH) y se inyectaron por vía subcutánea en la almohadilla de la pata de ratones Balb/c. Se administraron tres inyecciones adicionales en los Días 3, 7 y 10. Se sacrificaron los ratones al día siguiente y se recolectaron los nodos linfáticos periféricos. La mitad de cada uno de los nódulos linfáticos periféricos se trasplantó en ratones SCID. Se prepararon células de nódulos linfáticos a partir de la mitad restante de cada nódulo linfático y se fusionaron con células de mieloma P3U1 con una proporción de 5:1 en presencia de GenomeONE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.). Dichas células fusionadas se cultivaron en una placa de plástico de 96 pocillos. Después de 7 días de incubación (5% de CO₂, 37 °C), se recolectó el sobrenadante del cultivo.

Se administraron diez microgramos de la proteína Notch4 humano 3EGF-NRR-SEAP-His por vía intravenosa a dichos ratones SCID con trasplante de nódulos linfáticos en el día del trasplante y 6 días después del trasplante. Tres días después de la inmunización final, se recolectaron células de los nodos linfáticos periféricos, se fusionaron como se ha descrito anteriormente y se cultivaron.

Mediante los pasos anteriores, se obtuvieron anticuerpos monoclonales de ratón de 8 clones. Entre ellos, se seleccionó el anticuerpo principal más preferido (6-3-A6) basándose en la actividad inhibitoria de la señal específica de Notch4 y la actividad de unión a Notch4 de ratón y Notch4 humano.

Análisis de la secuencia del anticuerpo monoclonal anti-Notch4 humano de ratón (6-3-A6)

La secuencia de ADN que codifica las cadenas pesada y ligera del clon 6-3-A6 se amplificó mediante 5'-RACE (amplificación rápida 5' de los extremos de ADNc). Se preparó ARN completo a partir de dicho hibridoma con TRIZOL (Invitrogen/LifeTechnologies) y se trató utilizando DNasa (QIAGEN, conjunto de DNasa exento de RNasa). Se preparó ADNc bicatenario a partir de dicho ARN completo utilizando un kit de síntesis de ADNc (TAKARA). El adaptador 5' obtenido mediante la hibridación de ad29S (ACATCACTCCGT (SEQ ID NO. 2)) y ad29AS (ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT (SEQ ID NO. 3)) se añadió a dicho ADNc. El ADNc obtenido se amplificó con el cebador directo 5' (cebador 5'-PCR4, AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG (SEQ ID NO. 4)) y el cebador inverso 3' (GCCAGTGGATAGACTGATGG (SEQ ID NO. 5) se utilizó para amplificar la cadena pesada de IgG1 de ratón y GATGGATACAGTTGGTGCAGC (SEQ ID NO. 6) se utilizó para amplificar la cadena ligera de IgK de ratón). Dicho ADNc amplificado se insertó en el vector pCR2.1 (Invitrogen/LifeTechnologies). La secuencia del gen se analizó con ABI3130XL. La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia del gen identificada con este análisis se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-Notch4 humano de ratón (6-3-A6)

Nombre	Secuencia
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO. 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTTFSSYGMSWVRQTPDKRLE LVATINSNGGRYYPSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTA MYICARDQGFAYWGQGLTVTVSA
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO. 8)	

Nombre	Secuencia
	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKL LIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYS SYPWTFGGGTKLEIK

Tabla 2. Secuencia de ácidos nucleicos del anticuerpo anti-Notch4 humano de ratón 6-3-A6

Nombre	Secuencia
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO. 9)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAG GGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAG CTATGGCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAG TTGGTCGCAACCATTAAATAGTAATGGTGGTAGAACCTATTATCCAG ACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA CACCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCC ATGTATTACTGTGCAAGAGACCAGGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO. 10)	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACATCAGTAG GAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTAC TGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTA CTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCT TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAA TGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAGC AGCTATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Preparación de un anticuerpo anti-Notch4 humano quimérico y un anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado

Utilizando PCR de extensión con solapamiento, la secuencia génica de la región variable de la cadena pesada de 6-3-A6 se unió a la secuencia génica de la región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A como cadena pesada, y la secuencia génica de la región variable de la cadena ligera de 6-3-A6 se unió a la secuencia génica de la región constante de IgK humana como cadena ligera para preparar una secuencia de ADN que codificara un anticuerpo quimérico. Tal como se utiliza en la presente, «V234A» representa una mutación en la que la valina en la posición 234 se sustituye por alanina y «G237A» representa una mutación en la que la glicina en la posición 237 se sustituye por alanina. La secuencia obtenida como resultado se insertó en los vectores de expresión (pEE6. 4 para la cadena pesada y pEE12.4 para la cadena ligera, Lonza). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos del anticuerpo quimérico se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-Notch4 humano quimérico

Nombre	Secuencia (La región variable se indica en negrita y las CDR determinadas con el método de definición de Kabat en la región variable están <u>subrayadas</u> .)
Cadena pesada (SEQ ID NO. 11)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLE LVATINSNGGRTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTA MYYCARDQGFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPA APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena ligera (SEQ ID NO. 12)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPK LIIWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYS SYPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Tabla 4. Secuencia de ácidos nucleicos del anticuerpo anti-Notch4 humano quimérico

Nombre	Secuencia (La región variable se indica en negrita .)
Cadena pesada (SEQ ID NO. 13)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAG GGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAG CTATGGCATGTCTTGGGTTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAG TTGGTCGCAACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTATTATCCAG ACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA CACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCC ATGTATTACTGTGCAAGAGACCAGGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCTAGCACAAAAGGCCCTCTGT CTTCCCTCTGGCTCCCTGCTCCCGCTCCACCTCCGAGTCCACTGCC GCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTCACTG TGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGAGTCCACACATTTCC CGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTAGTGTGGTC ACCGTGCCTTCAAGCAATTTTCGGGACTCAGACCTATACATGCAACG

Nombre	Secuencia (La región variable se indica en negrita .)
	TGGACCATAAGCCATCTAATACTAAGGTCGATAAAACCGTGGAGCG AAAATGCTGCGTGGAATGCCACCTTGTCCTGCTCCACCAGCCGCT GCACCAAGCGTGTTCTGTTTCTCTCCAAAGCCCAAAGACACACTGA TGATCAGCAGAACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGTC CCACGAGGATCCCGAAGTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGGGTC GAAGTGCATAATGCAAAGACTAAACCTCGGGAGGAACAGTTCAACT CTACCTTTAGAGTCGTGAGTGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGACTG GCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGGCCTG CCCGCCCCTATCGAGAAAACAATTAGTAAGACTAAAGGCCAGCCAA GGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGTCGCGAGGAAATGAC AAAGAACCAGGTCTCACTGACTTGTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCA TCCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGACAGCCCGAAAACA ATTACAAGACCACACCACCCATGCTGGACAGCGATGGATCCTTCTT TCTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGC AATGTCTTTTCTGCTCTGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACT ACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGCAAATGA
Cadena ligera (SEQ ID NO. 14)	

Nombre	Secuencia (La región variable se indica en negrita .)
	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAG GAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTAC TGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTA CTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCT TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAA TGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAGC AGCTATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC GTACGGTCGCCGCCCTCCGTGTTTATTTTTCCTCCATCTGACGA ACAGCTGAAGAGTGGGACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAT TTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTCGACAACGCTC TGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTGAACAGGACAGCAA GGATTCCACCTATTCTCTGAGCTCCACCCTGACACTGAGCAAAGCA GATTACGAAAAGCACAAAGTCTATGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GGCTGAGCAGTCCAGTGACCAAGTCCTTTAACAGGGGAGAGTGTTG A

El anticuerpo se humanizó trasplantando la CDR del anticuerpo de ratón 6-3-A6 en la región variable de un anticuerpo humano. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo de ratón 6-3-A6 se numeró de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat utilizando el software Abysis (con licencia de UCL) y, basándose en esta numeración, dicha CDR se determinó de acuerdo con la definición de Kabat o el método de definición de AbM para identificar la CDR. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la CDR de 6-3-A6 se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de la CDR de 6-3-A6

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (definición de Kabat) (SEQ ID NO. 15)	SYGMS
CDR 1 de la cadena pesada (definición de AbM) (SEQ ID NO. 16)	GFTFSSYGMS
CDR 2 de la cadena pesada (definición de Kabat) (SEQ ID NO. 17)	TINSNGGRTYYPDSVKG
CDR 2 de la cadena pesada (definición de AbM) (SEQ ID NO. 18)	TINSNGGRTY
CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO. 19)	DQGFAY
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO. 20)	KASQDVGTAVA
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO. 21)	WASTRHT
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO. 22)	QQYSSYPWT

Tabla 6. Secuencia de ácidos nucleicos de la CDR de 6-3-A6

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (definición de Kabat) (SEQ ID NO. 23)	AGCTATGGCATGTCT

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (definición de AbM) (SEQ ID NO. 24)	GGATTCACCTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT
CDR 2 de la cadena pesada (definición de Kabat) (SEQ ID NO. 25)	ACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTATTATCCAGACAGTGTGA AGGGC
CDR 2 de la cadena pesada (definición de AbM) (SEQ ID NO. 26)	ACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTAT
CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO. 27)	GACCAGGGTTTTGCTTAC
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO. 28)	AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGCC
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO. 29)	TGGGCATCCACCCGGCACACT
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO. 30)	CAGCAATATAGCAGCTATCCGTGGACG

Basándose en la elevada homología respecto a la región de entramado (FR) de 6-3-A6, se seleccionó la FR de un anticuerpo humano, IGKV1-27*1 o IGKV3-15*1 y JK1 para la cadena ligera, e IGHV3-64*01 y JH4 para la cadena pesada como las FR del anticuerpo humanizado. A continuación, se empleó un modelo de predicción de la estructura 3D de 6-3-A6 de ratón para predecir el aminoácido en la FR que interactúa con el aminoácido de la CDR, y se trasplantó conjuntamente con la CDR. La región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y con o sin un residuo de lisina C-terminal, así como IgK humana se emplearon cada una como la región constante de las cadenas pesada y ligera. HK1, HK2 y HK3 se designaron como la cadena pesada del anticuerpo humanizado en la que se trasplantó la CDR determinada mediante el método de definición de Kabat, HA1 y HA2 se designaron como la cadena pesada del anticuerpo humanizado en la que se trasplantó la CDR determinada mediante el método de definición de AbM, L1, L2 y L5 se designaron como la cadena ligera del anticuerpo humanizado que emplea IGKV1-27*1 y JK1, y L3, L4 y L6 se designaron como la cadena ligera del anticuerpo humanizado que emplea IGKV3-15*1 y JK1. Las siguientes tablas muestran las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable del anticuerpo humanizado, la región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y con o sin un residuo de lisina C-terminal, así como IgK humana.

Tabla 7.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (HK1)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 31)	EVQLVESGGGLVQP ^{GGSLRLSCAASGFTF} <u>SSYGMSWVRQAPGKGLE</u> YVSTINSNGGR ^{TYYPDSVKGRFTISRDN} <u>SKNTLYLQMGSLRAEDMA</u> VYYCARDQGFAYWGQGLTVTVSS
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 32)	

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (HK1)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
	GAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGAG GGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTC CTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAG TATGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGCCGAACATACTATCCTG ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGAGATAACAGTAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGGGCAGCCTGAGAGCAGAAGACATGGCC GTCTACTATTGTGCAAGGGATCAGGGATTCGCATACTGGGGACAGG GAACTCTGGTGACCGTCTCAAGC

Tabla 8.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (HK2)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 33)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM^{SV}WRQAPGKGLE LVSTINSNGGR^{TY}YPDSVKGRFTISRDN^{SK}N^{TL}YLQMGS^{LR}RAEDMA VYYCARDQGFAYWGQGLVTVSS
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 34)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGAG GGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTC CTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAG CTGGTCAAGCACCATCAACTCCAATGGAGGCCGAACATACTATCCTG ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGAGATAACAGTAAGAA CACCTGTATCTGCAGATGGGCAGCCTGAGAGCAGAAGACATGGCC GTCTACTATTGTGCCCGAGATCAGGGGTTCGCTTATTGGGGACAGG GGACACTGGTGACCGTGAGCAGC

Tabla 9.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (HK3)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 35)	EVQLVESGGGLVQP ^{GGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLE} LVAT ^{INSNGGR} TYYPDSVKGRFTISRDN ^{SKNTLYLQMGSLKAEDMA} VYYCARD ^{QGFAYWGQ} TLVTSS
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 36)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGTGGGGGAGGCCTGGTGCAGCCAGGAG GGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTC CTACGGGATGTCCTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGACTGGAG CTGGTCGCCACCATCAACTCTAATGGAGGCCGAACATACTATCCTG ACAGTGTGAAGGGCCGGTTCACTATTAGCAGAGATAACTCCAAAAA TACCCTGTATCTGCAGATGGGCAGCCTGAAGGCAGAAGACATGGCC GTCTACTATTGTGCTCGGGATCAGGGGTTTCGCTATTGGGGGCAGG GGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC

Tabla 10.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (HA1)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de AbM están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 37)	EVQLVESGGGLVQP ^{GGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLE} YVST ^{INSNGGR} TYYANSVKGRFTISRDN ^{SKNTLYLQMGSLRAEDMA} VYYCARD ^{QGFAYWGQ} TLVTSS
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 38)	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGGGGGGACTGGTGCAGCCAGGAG GGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTC CTACGGGATGTCCTTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGGAAGGGACTGGAG TATGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGCCGAACATACTATGCCA ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGAGACAACAGTAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGGGCAGCCTGAGAGCAGAAGATATGGCC GTCTACTATTGTGCTCGGGATCAGGGCTTTGCTTATTGGGGACAGG GGACACTGGTCACCGTCTCTCTCC

Tabla 11.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (HA2)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de AbM están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 39)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLE LVSTINSNGGR ¹ TY ² YANSVKGRFTISRDN ³ SKNTLYLQ ⁴ MGSLRAEDMA VYYCARDQGFAYWGQGLVTVSS
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 40)	GAGGTGCAGCTGGTCCAATCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGAG GGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTC CTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGGAAGGGACTGGAG CTGGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGCCGAACATACTATGCCA ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGAGACAACAGTAAGAA CACCCTGTATCTGCAGATGGGCAGCCTGAGAGCAGAAGATATGGCC GTCTACTATTGTGCTCGGGATCAGGGCTTCGCCTACTGGGGGCAGG GAACACTGGTCACCGTCTCCTCA

Tabla 12.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (L1)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 41)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVGTA ¹ VAWYQQKPGKVPKL LIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLT ² ISS ³ LQPEDVATYYCQ ⁴ QYS SYPWTFGQGTKVEIK
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 42)	GACATTCAGATGACACAGAGCCCTTCATCTCTGAGTGCATCAGTGG GAGACAGGGTCACCATCACATGCAAAGCCAGCCAGGATGTGGGAAC CGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAAGTGCCTAAGCTG CTGATCTACTGGGCTAGTACACGGCACACTGGCGTCCCATCCAGAT TCAGCGGCTCCGGGTCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATCAGCTC CCTGCAGCCCGAGGATGTGGCCACATACTATTGCCAGCAGTATTCA TCTTATCCTTGGACCTTCGGACAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

Tabla 13.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (L2)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 43)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKVPKL LIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYFCQQYS SYPWTFGQGTKVEIK
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 44)	GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCTCTGAGTGCATCAGTGG GAGACAGGGTCACCATCACATGCAAAGCCAGCCAGGATGTGGGAAC CGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAAGTGCCTAAGCTG CTGATCTACTGGGCTAGTACACGGCACACTGGCGTCCCATCCAGAT TCAGCGGCTCCGGGTCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATCAGCTC CCTGCAGCCCCGAGGATGTGGCCACATACTTCTGCCAGCAGTATTCA TCCTATCCTTGGACCTTCGGACAGGGAAGTAAAGTGGAGATTAAG

Tabla 14.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (L3)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 45)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVGTAVAWYQQKPGQAPRL LIYWASTRHTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYS SYPWTFGQGTKVEIK
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 46)	GAAATTGTGATGACCCAGTCTCCCGCCACACTGTCTGTGAGTCCAG GAGAGAGGGCAACTCTGTCTTGCAAGGCCAGTCAGGACGTGGGAAC CGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCTCCTCGGCTG CTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACCGGCATTCCCGCCAGAT TCTCAGGCAGCGGTCGGAACAGAGTTTACCCTGACAATCAGCTC CCTGCAGAGCGAAGATTTGCTGTCTACTATTGCCAGCAGTATTCT AGTTATCCTTGGACATTTCGGCCAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

Tabla 15.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (L4)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 47)	EIVMTQSPATLSVSPGERATL<u>SCKASQDVGTA</u>VAWYQQKPGQAPRL LIYWASTRHTGIPARFSGSGSGTEFTLT<u>ISSLQSEDFAVYFCQQYS</u> <u>SYPWTFGQGTKVEIK</u>
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 48)	GAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCAACACTGTCTGTGAGTCCAG GAGAGAGGGCAACTCTGTCTTGCAAGGCCAGTCAGGACGTGGGAAC <u>CGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCTCCTCGGCTG</u> <u>CTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACCGGCATTCCCGCCAGAT</u> TCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACAGAGTTTACCCTGACAATCAGCTC CCTGCAGAGCGAAGATTTGCTGTCTACTTTTGCCAGCAGTATTCA <u>TCCTATCCTTGGACCTTCGGACAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA</u>

Tabla 16.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (L5)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 49)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVGTAWYQQKPGKSPKL LIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLT<u>ISSLQPEDVATYFCQQYS</u> <u>SYPWTFGQGTKVEIK</u>
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 50)	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGTCCGCATCTGTGG GCGACCGGGTCACCATTACATGTAAAGCCAGTCAGGATGTGGGAAC <u>AGCCGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAATCTCCTAAGCTG</u> <u>CTGATCTATTGGGCTTCCACACGGCACACTGGCGTGCCCTCTAGAT</u> TCAGTGGCTCAGGGAGCGGAACAGACTTTACTCTGACCATTTCTAG TCTGCAGCCAGAGGATGTGGCAACTTACTTCTGCCAGCAGTACTCA <u>AGCTATCCCTGGACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTCGAAATCAAG</u>

Tabla 17.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (L6)	
Nombre	Secuencia (Las CDR determinadas con el método de definición de Kabat están subrayadas.)
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 51)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPRL LIYWASTRHTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYS SYPWTFGQGTKVEIK
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 52)	GAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCAACACTGTCTGTGAGTCCAG GAGAGAGGGCAACTCTGTCTTGCAAGGCCAGTCAGGACGTGGGAAC CGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAGTCTCCTCGGCTG CTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACCGGCATTCCCGCCAGAT TCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACAGAGTTTACCCTGACAATCAGCTC CCTGCAGAGCGAAGATTTGCTGTCTACTTTTGCCAGCAGTATTCA TCCTATCCTTGGACCTTCGGACAGGGAACAAAAGTGGAATCAAA

Tabla 18.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y lisina C-terminal	
Nombre	Secuencia
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 53)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNT KVDKTVRKKCCVECPPCPAPPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPM LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 54)	

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y lisina C-terminal	
Nombre	Secuencia
	GCTAGCACAAAAGGCCCTCTGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCTCCC GCTCCACCTCCGAGTCCACTGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGA TTACTTCCCTGAGCCAGTCACTGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGAGTCCACACATTTCCCGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGCC TGTACTCCCTGTCTAGTGTGGTCACCGTGCCTTCAAGCAATTTTCGG GACTCAGACCTATACATGCAACGTGGACCATAAGCCATCTAATACT AAGGTCGATAAAACCGTGGAGCGAAAATGCTGCGTGGAATGCCCAC CTTGTCCTGCTCCACCAGCCGCTGCACCAAGCGTGTTCCTGTTTCC TCCAAAGCCCAAAGACACACTGATGATCAGCAGAACTCCTGAGGTC ACCTGCGTGGTCTGTTGACGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTCCAGT TTAACTGGTACGTGGATGGGGTCGAAGTGCATAATGCAAAGACTAA ACCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTTAGAGTCGTGAGTGTG CTGACAGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAGGAGTATAAGT GCAAAGTGTCTAATAAGGGCCTGCCCCCCCCTATCGAGAAAACAAT TAGTAAGACTAAAGGCCAGCCAAGGGAACCCAGGTGTACACACTG CCCCCTAGTCGCGAGGAAATGACAAAGAACCAGGTCTCACTGACTT GTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCATCCGACATTGCCGTGGAGTGGGA ATCTAATGGACAGCCCGAAAACAATTACAAGACCACACCACCCATG CTGGACAGCGATGGATCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTGG ATAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGCTCTGTGAT GCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTG TCTCCTGGCAAATGA

Tabla 19.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y sin lisina C-terminal	
Nombre	Secuencia
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 55)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNT KVDKTVKRCCKVECPGPCAPPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTQVVDQDLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPM LDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
Secuencia de ácidos	

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y sin lisina C-terminal	
Nombre	Secuencia
nucleicos (SEQ ID NO. 56)	GCTAGCACAAAAGGCCCTCTGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCTCCC GCTCCACCTCCGAGTCCACTGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGA TTACTTCCCTGAGCCAGTCACTGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGAGTCCACACATTTCCCGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGCC TGTACTCCCTGTCTAGTGTGGTCACCGTGCCTTCAAGCAATTTCCG GACTCAGACCTATACATGCAACGTGGACCATAAGCCATCTAATACT AAGGTCGATAAAACCGTGGAGCGAAAATGCTGCGTGGAATGCCCAC CTTGTCCTGCTCCACCAGCCGCTGCACCAAGCGTGTTCTCTGTTTCC TCCAAAGCCCCAAAGACACACTGATGATCAGCAGAACTCCTGAGGTC ACCTGCGTGGTTCGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTCCAGT TTAACTGGTACGTGGATGGGGTCGAAGTGCATAATGCAAAGACTAA ACCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTTAGAGTCGTGAGTGTG CTGACAGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGT GCAAAGTGTCTAATAAGGGCCTGCCCGCCCCTATCGAGAAAACAAT TAGTAAGACTAAAGGCCAGCCAAGGGAACCCCAGGTGTACACACTG CCCCCTAGTCGCGAGGAAATGACAAAGAACCAGGTCTCACTGACTT GTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCATCCGACATTGCCGTGGAGTGGGA ATCTAATGGACAGCCCCGAAAACAATTACAAGACCACACCACCCATG CTGGACAGCGATGGATCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTGG ATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGCTCTGTGAT GCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTG TCTCCTGGCTGA

Tabla 20.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región constante de Igk humana	
Nombre	Secuencia
Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 57)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 58)	

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región constante de Igk humana	
Nombre	Secuencia
	CGTACGGTCGCCGCCCCCTCCGTGTTTATTTTTCCTCCATCTGACG AACAGCTGAAGAGTGGGACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA TTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTCGACAACGCT CTGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTGACTGAACAGGACAGCA AGGATTCCACCTATTCTCTGAGCTCCACCCTGACACTGAGCAAAGC AGATTACGAAAAGCACAAAGTCTATGCCTGCGAAGTGACCCACCAG GGGCTGAGCAGTCCAGTGACCAAGTCCTTTAACAGGGGAGAGTGTT GA

5 Las secuencias génicas de la región variable de estos anticuerpos humanizados se sintetizaron utilizando GenScript USA Inc., y se insertaron en la región constante de IgG2 humana con o sin una lisina C-terminal o pcDNA3.3 (Invitrogen) que comprendía la secuencia de ADN que codifica la región constante de IgK humana. Dichos vectores de expresión se transfectaron en células FreeStyle 293-F (Invitrogen) utilizando el sistema de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) con el fin de producir los anticuerpos. El sobrenadante se recolectó y se purificó utilizando Proteína A (GE Healthcare) .

10 Las secuencias génicas de longitud completa (región variable + región constante) de los anticuerpos humanizados se optimizaron de forma similar, se sintetizaron completamente con GenScript USA Inc., y la cadena pesada se insertó en pEE6.4 y la cadena ligera se insertó en pEE12.4 (Lonza). Estos vectores de expresión se emplearon como antes con el fin de producir los anticuerpos. Las secuencias de nucleótidos optimizadas de los anticuerpos humanizados se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 21.

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de HK2 + región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y sin lisina C-terminal)	
Nombre	Secuencia
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 59)	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGGGGGGGTCTGGTGCAGCCAGGCG GATCCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGGTTCACATTTTCCAG CTACGGCATGTCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAG CTGGTGAGTACAATCAACTCAAATGGGGGTCTGAACTTACTATCCCG ACTCCGTGAAGGGCAGGTTCACTATTTCCCGGGATAACAGCAAAAA TACCCTGTACCTGCAGATGGGGTCCCTGCGAGCTGAAGACATGGCA GTGTACTATTGTGCCCCGTGATCAGGGTTTCGCTTATTGGGGGCAGG GTACTCTGGTCACCGTGTCTAGTGCTTCTACCAAGGGACCATCCGT GTTCCCACTGGCACCATGCTCCCGGAGCACATCTGAGAGTACTGCA GCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAACCAGTCACAG TGAGCTGGAACCTCTGGCGCACTGACAAGCGGAGTCCACACTTTTCC TGCCGTGCTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCTCTGAGCTCTGTGGTC ACTGTCCCCAGTTCAAATTTCTGGAACCTCAGACCTATACATGCAACG TGGACCATAAGCCTAGCAATACCAAGGTCGATAAAACAGTGGAGCG TAAATGCTGCGTGGAATGCCACCTTGTCCAGCACCACCAGCTGCA GCCCCCTTCCGTGTTTCTGTTTCTCCAAAGCCAAAAGACACCCTGA TGATCTCTAGAACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTTCGTGGACGTGAG TCACGAGGATCCTGAAGTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTC GAAGTGCATAATGCCAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTTCAACT CAACCTTTTCGCGTCGTGTCCGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGATTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGACTG CCCGCTCCTATCGAGAAAATATTTCCAAGACCAAAGGACAGCCTA GGGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTTCCCGGGAGGAAATGAC TAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCT AGTGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCAAATGGTCAGCCAGAGAACA ATTACAAGACCACACCACCATGCTGGACAGTGATGGCTCATTCTT TCTGTATAGCAAGCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGA AACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCACTGCACAACCATT ACACCCAGAAATCCCTGAGCCTGTCCCCCGGCTGA

Tabla 22.

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de HK3 + región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y sin lisina C-terminal)	
Nombre	Secuencia
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 60)	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGTCTGGTGCAGCCAGGAG GATCCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCTTCTGGGTTCACATTTTCCAG CTACGGCATGTCCTGGGTCCGGCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGAG CTGGTGGCCACAATCAACAGTAATGGGGGTAGAACTTACTATCCCG ACTCAGTGAAGGGCAGGTTCACTATTAGTCGGGATAACTCAAAAAA TACCCTGTACCTGCAGATGGGGTCCCTGAAGGCTGAAGACATGGCA GTGTACTATTGTGCCCCGATCAGGGTTTCGCTTATTGGGGGCAGG GTACTCTGGTCACCGTGTCTAGTGCCTCCACCAAGGGCCCAGCGT GTTTCCACTGGCTCCCTGCTCCCGAAGCACATCTGAGAGTACTGCA GCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAACCAGTCACAG TGAGCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACATCTGGAGTCCACACTTTTCC TGCAGTGCTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCCCTGAGCTCTGTGGTC ACTGTCCCCAGTTCAAATTTTCGGAACCTCAGACCTATACATGCAACG TGGACCATAAACCTAGCAATACCAAGGTCGATAAAACAGTGGAGCG GAAGTGCTGTGTGGAATGCCACCTTGTCCAGCTCCACCAGCTGCA GCCCCCTTCTGTGTTTCTGTTTCTCCAAAGCCAAAGACACCCTGA TGATCAGCAGGACCCCCGAGGTCACATGTGTGGTCTGTGGACGTGTC TCACGAGGATCCTGAAGTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTC GAAGTGCATAATGCAAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTTCAACT CTACCTTTTCGCGTCGTGAGTGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGATTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGACTG CCCGCCCCCTATCGAGAAACTATTAGCAAGACCAAAGGACAGCCTC GAGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTAGTCGTGAGGAAATGAC TAAGAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCT AGCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGTCAGCCAGAGAACA ATTACAAGACCACACCACCCATGCTGGACAGTGATGGCTCATTCTT TCTGTATTCAAAGCTGACCGTCGATAAATCCAGGTGGCAGCAGGGA AATGTGTTTTTCATGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCATT ACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCTGA

Tabla 23.

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de HA2 + región constante de IgG2 humana con las mutaciones V234A y G237A y sin lisina C-terminal)	
Nombre	Secuencia
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 61)	GAAGTGCAGCTGGTCTGAGTCTGGGGGGGGCTGGTGCAGCCTGGCG GATCCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGGTTCACATTTTCCAG CTACGGCATGTCCTGGGTCCGCCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGAG CTGGTGAGTACAATCAACTCAAATGGGGGTGGAACCTTACTATGCTA ACTCCGTGAAGGGCAGGTTCACTATTTCCCGGGACAACAGCAAAAA TACCCTGTACCTGCAGATGGGGTCCCTGCGAGCTGAAGACATGGCA GTGTACTATTGTGCCCCGTGATCAGGGTTTCGCTTATTGGGGGCAGG GTACTCTGGTCACCGTGTCTAGTGCTTCTACCAAGGGGCCAGTGT GTTTCCACTGGCACCCCTGCTCCCGGAGCACATCTGAGAGTACTGCA GCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGATTATTTCCCTGAACCAGTCACAG TGAGCTGGAACCTCTGGCGCACTGACAAGCGGAGTCCACACTTTTCC TGCCGTGCTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCTCTGAGCTCTGTGGTC ACTGTCCCCAGTTCAAATTTTCGGAACCTCAGACCTATACATGCAACG TGGACCATAAGCCTAGCAATACCAAGGTCGATAAAACAGTGGAGCG TAAATGCTGTGTGGAATGCCACCTTGTCCAGCTCCACCAGCTGCA GCCCCCTTCTGTGTTCTGTTTCCCTCAAAGCCAAAGACACCCTGA TGATCTCTAGAACCCCCGAGGTACATGTGTGGTCGTGGACGTCAG TCACGAGGATCCAGAAGTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTC GAAGTGCATAATGCAAAGACAAAACCCAGAGAGGAACAGTTCAACT CAACCTTTTCGCGTCGTGTCCGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGACTG CCCGCCCCCTATCGAGAAAACCTATTTCCAAGACCAAAGGACAGCCTA GGGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTTCCCGGGAGGAAATGAC TAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCT AGTGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCAAATGGTCAGCCAGAGAACA ATTACAAGACCACACCACCCATGCTGGACAGTGATGGCTCATTCTT TCTGTATAGCAAGCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGA AATGTGTTTTTCATGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACT ACACACAGAAAAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTGA

Tabla 24.

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de L3 + región constante de Igk humana)	
Nombre	Secuencia
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 62)	GAAATCGTGATGACTCAGTCCCCCGCTACACTGAGCGTGTCTCCCG GAGAGAGAGCTACTCTGTCTTGCAAGGCAAGTCAGGACGTGGGAAC TGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCACGACTG CTGATCTATTGGGCTAGTACAAGGCACACTGGCATTCTCTGCCCGGT TCAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAGTTTACCCTGACAATCTCCAG CCTGCAGTCCGAAGATTTTCGCTGTGTACTATTGCCAGCAGTACTCT AGTTATCCTTGGACCTTTGGTCAGGGCACAAGGTGAGATCAAAC GAACCGTGGCCGCTCCAAGCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGA ACAGCTGAAGTCAGGTACAGCCTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAAT TTCTACCCAAGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCC TGCAGAGCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAA GGATTCCACCTATAGCCTGTCATCCACTCTGACCCTGAGCAAAGCT GACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTCACACACCAGG GTCTGAGTTCTCCAGTCACCAAATCTTTTAATAGAGGCGAGTGCTG A

Tabla 25.

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de L4 + región constante de Igk humana)	
Nombre	Secuencia
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 63)	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTACACTGAGCGTGTCTCCCG GAGAGAGAGCTACTCTGTCTTGCAAGGCAAGTCAGGACGTGGGAAC TGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCACGACTG CTGATCTATTGGGCTAGTACAAGGCACACTGGCATTCTCTGCCCGGT TCAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAGTTTACCCTGACAATCTCCAG CCTGCAGTCCGAAGATTTTCGCTGTGTACTTTTGCCAGCAGTACTCT AGTTATCCTTGGACCTTCGGTCAGGGCACAAGGTGAGATCAAAC GAACCGTGGCCGCTCCAAGCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGA ACAGCTGAAGTCAGGTACAGCCTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAAT TTTTACCCAAGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCC TGCAGAGCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAA

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de L4 + región constante de Igk humana)	
Nombre	Secuencia
	GGATTCCACCTATAGCCTGTCATCCACTCTGACCCTGAGCAAAGCT GACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTCACACACCAGG GTCTGTCCAGTCCAGTACCAAATCCTTTAATCGGGGAGAGTGCTG A

Tabla 26.

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de L5 + región constante de Igk humana)	
Nombre	Secuencia
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 64)	GATATTCAGATGACCCAGTCTCCTTCCAGCCTGTCTGCAAGTGTGG GAGACAGGGTCACCATCACATGCAAAGCCTCCCAGGATGTGGGAAC CGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGCTG CTGATCTACTGGGCTTCTACCAGGCACACAGGCGTGCCAAGTCGGT TCTCAGGCTCCGGAAGCGGGACCGACTTTACTCTGACCATCTCCAG CCTGCAGCCTGAGGATGTGGCAACATACTTCTGCCAGCAGTACTCT AGTTATCCATGGACTTTTGGTCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGA GAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTAGCGACGA ACAGCTGAAGAGTGGTACAGCCTCAGTGGTCTGTCTGCTGAACAAT TTCTACCCTAGGGAGGCTAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCAC TGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTGACAGAACAGGACTCCAA AGATAGCACTTATTCTCTGTCTCATCCACTGACTCTGTCTAAGGCC GACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAGGTCACACACCAGG GTCTGAGCAGTCCAGTACCAAGAGCTTTAACCGAGGAGAGTGCTG A

Tabla 27.

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de L6 + región constante de Igk humana)	
Nombre	Secuencia
Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO. 65)	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTACACTGAGCGTGTCTCCCG GAGAGAGAGCTACTCTGTCTTGCAAGGCAAGTCAGGACGTGGGAAC TGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGAGTCCCCGCCTG CTGATCTATTGGGCTCCACAAGGCACACTGGCATTCTGCTCGGT TCAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAGTTTACCCTGACAATCTCCAG

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado (región variable de L6 + región constante de Igk humana)	
Nombre	Secuencia
	CCTGCAGAGCGAAGATTTGCGCGTGTACTTTTGCCAGCAGTACTCT AGTTATCCTTGGACCTTCGGTCAGGGCACAAAGGTCGAGATCAAAC GAACCGTGGCCGCTCCAAGCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGA ACAGCTGAAGTCAGGTACAGCTTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAAT TTTTACCCAAGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCC TGCAGAGCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAA GGATTCCACCTATAGCCTGTCATCCACTCTGACCCTGTCTAAAGCT GACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTCACCCACCAGG GGCTGAGTAGTCCAGTCACCAAGAGTTTAAATCGGGGCGAGTGTG A

En los siguientes Ejemplos, se llevaron a cabo experimentos con anticuerpos que comprenden las secuencias de aminoácidos de la CDR del anticuerpo 6-3-A6 determinada en el Ejemplo 1.

- 5 Por conveniencia, se hará referencia a los anticuerpos específicos empleados en el siguiente Ejemplo como «Anticuerpo A», «Anticuerpo B», «Anticuerpo C», «Anticuerpo D», «Anticuerpo E», «Anticuerpo F» y «Anticuerpo G».

10 En el Anticuerpo A, la región variable de la cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de HK2 descrita en el Ejemplo 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de L3 descrita en el Ejemplo 1.

15 En el Anticuerpo B, la región variable de la cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de HK3 descrita en el Ejemplo 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de L3 descrita en el Ejemplo 1.

En el Anticuerpo C, la región variable de la cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de HK2 descrita en el Ejemplo 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de L4 descrita en el Ejemplo 1.

20 En el Anticuerpo D, la región variable de la cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de HK3 descrita en el Ejemplo 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de L5 descrita en el Ejemplo 1.

25 En el Anticuerpo E, la región variable de la cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de HK2 descrita en el Ejemplo 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de L6 descrita en el Ejemplo 1.

30 En el Anticuerpo F, la región variable de la cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de HA2 descrita en el Ejemplo 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de L3 descrita en el Ejemplo 1.

35 En el Anticuerpo G, la región variable de la cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de HK3 descrita en el Ejemplo 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de L4 descrita en el Ejemplo 1.

Cabe destacar que en los Anticuerpos A - G, la lisina (Lys) que está situada en el extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo humano común se ha eliminado.

Ejemplo 2: Actividad neutralizante del anticuerpo anti-Notch4 humano

La actividad neutralizante del anticuerpo anti-Notch4 humano (Anticuerpo B) se evaluó con el ensayo marcador de luciferasa Notch4-GAL4. Este experimento es un sistema experimental que evalúa la transducción de señales específica para Notch4 evaluando la actividad de luciferasa cuando la línea celular b.end3 en la que se ha introducido un gen modificado que tiene una parte del dominio intracelular de Notch4 sustituido por el dominio de unión de ADN de GAL4 así como un vector de expresión del gen fusionado entre UAS de GAL4 y 2CP de la luciferasa (que se denomina en lo sucesivo en la presente «célula marcadora») se estimula con DLL4, que es un ligando de Notch.

Se disolvió DLL4 humano recombinante (R&D Systems, 1506-D4-050/CF) en PBS para preparar una solución de 10 µg/mL (en lo sucesivo en la presente solución de DLL4). En una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano (Greiner, 655083), se dispensaron 50 µL/pocillo (500 ng/pocillo) de la solución de DLL4 y 50 µL/pocillo de PBS para los pocillos no estimulados, y esto se dejó reposar durante toda la noche a 4 °C para permitir que DLL4 pasara a fase sólida en la placa blanca de 96 pocillos. Las células marcadoras se suspendieron en un medio de cultivo de D-MEM que comprendía un 10% de suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomicina para preparar una suspensión celular con una densidad de 1×10^5 /mL. Cada pocillo con DLL4 en fase sólida se lavó tres veces con PBS y se sembraron 50 µL/pocillo (5000 células/pocillo) de la suspensión celular. Las diluciones del anticuerpo anti-Notch4 humano (concentraciones finales: 0, 0.00064, 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2 y 10 µg/mL) o IgG2 κ humana (SIGMA, 15404, concentración final: 10 µg/mL) se añadieron cada una en una cantidad de 50 µL y esto se cultivó a 37 °C durante 22 horas. La actividad de luciferasa de las células marcadoras se evaluó con el sistema de ensayo Steady-Glo (Promega, E2510) como se indica a continuación.

Se añadieron cien microlitros de solución Steady-Glo a cada pocillo, después se cultivaron, agitaron y a continuación se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la luminiscencia con un lector de placas Multilabel (Envision 2102-0020, Perkin Elmer). Se calculó la luminiscencia relativa (%) a partir del valor de luminiscencia medido utilizando la siguiente fórmula.

Luminiscencia relativa (%) = (Intensidad de luminiscencia de los pocillos de las muestras – Intensidad de luminiscencia promedio de los pocillos no estimulados) / (Intensidad de luminiscencia promedio de los pocillos de control – Intensidad de luminiscencia promedio de los pocillos no estimulados)

La correlación entre la concentración de Anticuerpo B y el valor de luminiscencia relativa (%) se muestra en la Figura 1. La gráfica de la Figura 1 muestra el valor promedio de los resultados de tres pruebas independientes y la barra de error muestra la desviación estándar de estos. El valor de IC₅₀ fue de 0.011 µg/mL (95% de IC; 0.0036 - 0.034).

A continuación, se llevaron a cabo experimentos similares para una pluralidad de anticuerpos anti-Notch4 humanos, que incluyeron el Anticuerpo B (Anticuerpo A, Anticuerpo B, Anticuerpo C, Anticuerpo D, Anticuerpo E, Anticuerpo F y Anticuerpo G) y se midió la actividad neutralizante de los anticuerpos.

Se disolvió DLL4 humano recombinante (R&D Systems, 1506-D4-050/CF) en PBS para preparar una solución de 10 µg/mL (en lo sucesivo en la presente solución de DLL4). En una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano (Greiner, 655083), se dispensaron 50 µL/pocillo (500 ng/pocillo) de la solución de DLL4 y 50 µL/pocillo de PBS para los pocillos no estimulados, y esto se dejó reposar durante toda la noche a 4 °C para permitir que DLL4 pasara a fase sólida en la placa blanca de 96 pocillos. Las células marcadoras se suspendieron en un medio de cultivo de D-MEM que comprendía un 10% de suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomicina para preparar una suspensión celular con una densidad de 1×10^5 /mL. Cada pocillo con DLL4 en fase sólida se lavó tres veces con PBS y se sembraron 50 µL/pocillo (5000 células/pocillo) de la suspensión celular. Cada dilución del anticuerpo anti-Notch4 humano (concentraciones finales: 0 y 10 µg/mL) o IgG2 κ humana (SIGMA, 15404, concentración final: 10 µg/mL) se añadió en una cantidad de 50 µL y esto se cultivó a 37 °C durante 22 horas. La actividad de luciferasa de las células marcadoras se evaluó con el sistema de ensayo Dual luc-Glo (Promega, E2940) como se indica a continuación.

Se añadieron cien microlitros de solución del sustrato luciferasa Dual-Glo a cada pocillo, después se cultivaron, agitaron y a continuación se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se midió la luminiscencia de la luciferasa de luciérnaga con un lector de placas Multilabel (Envision 2102-0020, Perkin Elmer). A continuación, se añadieron 100 µL de solución de sustrato Dual-Glo Stop & Glo a cada pocillo, se agitaron y a continuación se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se midió la luminiscencia de la luciferasa de *Renilla* con un lector de placas Multilabel (Envision 2102-0020, Perkin Elmer). Se calculó la luminiscencia relativa de cada pocillo (luciferasa de luciérnaga/luciferasa de *Renilla*) a partir del cociente de los valores de luminiscencia. Además, se calculó la luminiscencia relativa (%) de cada valor calculado utilizando la siguiente fórmula y se evaluó la actividad inhibitoria de la señal de Notch4 de cada anticuerpo.

Luminiscencia relativa (%) = (Luminiscencia relativa promedio de los pocillos de las muestras - Luminiscencia relativa promedio de los pocillos no estimulados) / (Luminiscencia relativa promedio de los pocillos de control - Luminiscencia relativa promedio de los pocillos no estimulados)

En la siguiente Tabla 28 se describe la actividad inhibitoria de la señal de Notch4 para cada anticuerpo (pruebas realizadas con una concentración de 10 µg/mL).

En la siguiente tabla, por ejemplo, la descripción «HK2L3 (Lys-)» significa que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado que se emplea en el experimento es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado correspondiente a la cadena pesada de HK2 en el Ejemplo 1, la región variable de la cadena ligera es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado correspondiente a la cadena ligera de L3 en el Ejemplo 1, y la lisina (Lys) situada en el extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo humano común se ha eliminado en este anticuerpo.

Tabla 28.

Muestra	Cadena H/L	% de control	D. E.	Valor p
Anticuerpo A	HK2L3 (Lys-)	0,1	3,2	5,9E-11
Anticuerpo B	HK3L3 (Lys-)	10,8	11,4	8,3E-07
Anticuerpo C	HK2L4 (Lys-)	-9,9	14,0	8,0E-07
Anticuerpo D	HK3L5 (Lys-)	21	8	1,8E-07
Anticuerpo E	HK2L6 (Lys-)	5	3	1,7E-11
Anticuerpo F	HA2L3 (Lys-)	17	5	3,5E-09
Anticuerpo G	HK3L4 (Lys-)	13	9	2,4E-07

Ejemplo 3: Análisis cinético de la unión del anticuerpo anti-Notch4 humanizado a una proteína de dominio Notch4-NRR recombinante

Se llevó a cabo un análisis cinético de la interacción de los dominios Notch4-NRR de ser humano, mono cinomólogo, ratón y rata con el Anticuerpo B con BIACORE. El Anticuerpo B se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína A a partir del sobrenadante del cultivo de una línea celular CHO estable transfectada con el Anticuerpo B. Los dominios Notch4-NRR de ser humano, mono, ratón y rata se prepararon como proteínas de fusión con fosfatasa alcalina secretora (SEAP) y 10 x marca de histidina. Los genes para estas proteínas se transfectaron en células Expi293F en Opti-MEM (INVITROGEN) utilizando ExpiFectamine 293. Estas células se cultivaron en medio de expresión Expi293 (INVITROGEN). Resumiendo, las células se diluyeron hasta obtener 7.5×10^7 células/25.5 mL y se transfectaron con el reactivo ExpiFectamine 293 el Día 0. Aproximadamente 16 horas después de la transfección, se añadieron 150 uL del Potenciador de la transfección 1 ExpiFectamine 293 y 1.5 mL del Potenciador de la transfección 2 ExpiFectamine 293 a cada recipiente. El sobrenadante se recolectó el Día 4. Estos antígenos se purificaron con una columna de superflujo Ni-NTA (QIAGEN). La interacción se analizó como se indica a continuación. El Anticuerpo B purificado fue capturado por un anticuerpo Fc anti-IgG humana fijado sobre un chip sensor CM5 (GE healthcare). Las proteínas de fusión Notch4-NRR purificadas se inyectaron sobre el chip sensor con 8 concentraciones diferentes y se observó su interacción y disociación según las instrucciones del fabricante.

Tabla 29. Parámetros cinéticos calculados del Anticuerpo B

Proteína	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
Notch4-NRR de ser humano	3,17E+05	1,18E-03	3,74E-09
Notch4-NRR de mono cinomólogo	2,95E+05	1,06E-03	3,62E-09
Notch4-NRR de ratón	6,01E+05	7,27E-03	1,12E-08
Notch4-NRR de rata	ND	ND	ND

Se llevó a cabo un análisis cinético de anticuerpos humanizados inhibitorios anti-Notch4 adicionales tal como se indica a continuación. Se expresaron proteínas de fusión Fc Notch4 humano-dominio NRR con una línea celular CHO. El antígeno en el sobrenadante del cultivo fue capturado por el anticuerpo anti-Notch4 humano fijado sobre un chip sensor CM5 que reconoce diferentes epítomos de Notch4 humano. A continuación, el anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado se inyectó sobre el chip sensor con diferentes concentraciones. Se calcularon sus constantes de interacción y disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

En la siguiente tabla, por ejemplo, la descripción «HK2L3 (Lys-)» significa que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado que se emplea en el experimento es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado correspondiente a la cadena pesada de HK2 en el Ejemplo 1, la región variable de la cadena ligera es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Notch4 humano humanizado correspondiente a la cadena ligera de L3 en el Ejemplo 1, y la lisina (Lys) situada en el extremo C-terminal

de la cadena pesada de un anticuerpo humano común se ha eliminado en este anticuerpo. Los casos sin la descripción «(Lys-)» se refieren a que la Lys localizada en el extremo C- terminal de la cadena pesada del anticuerpo humano no se ha eliminado.

5 Tabla 30.

Parámetros cinéticos calculados de anticuerpos inhibitorios anti-Notch4 humanizados frente a la proteína de fusión Notch4 humano-NRR					
Muestra	Cadena H/L	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmáx1 (RU)
Anticuerpo A	HK2L3 (Lys-)	1,62E+06	8,89E-04	5,55E-10	33,4
Anticuerpo B	HK3L3 (Lys-)	1,66E+06	7,10E-04	4,41E-10	26,2
Anticuerpo C	HK2L4 (Lys-)	1,91E+06	1,06E-03	5,56E-10	35,9
Anticuerpo D	HK3L5 (Lys-)	1,82E+06	8,63E-04	4,75E-10	37
Anticuerpo E	HK2L6 (Lys-)	2,23E+06	1,15E-03	5,19E-10	28,9
Anticuerpo F	HA2L3 (Lys-)	1,55E+06	1,36E-03	9,82E-10	20,2
Anticuerpo G	HK3L4 (Lys-)	1,78E+06	1,11E-03	6,33E-10	29,2

En la Tabla 31 se muestran resultados experimentales de experimentos similares a los de la Tabla 30 anterior llevados a cabo con más anticuerpos adicionales.

10 Tabla 31.

N.º	Construido de HL	ka (promediada)	kd (promediada)	KD (promediada)	N
6-3-A6	Original	2,35E+06	7,42E-04	3,21E-10	9
37	HK3L3 (Lys-)	2,48E+06	8,22E-04	3,31E-10	2
34	HK2L3 (Lys-)	5,05E+06	1,24E-03	3,95E-10	2
31	HA2L3 (Lys-)	3,50E+06	8,94E-04	4,34E-10	2
39	HK3L5 (Lys-)	2,10E+06	1,09E-03	5,29E-10	5
15	HK2L5	2,07E+06	1,12E-03	5,49E-10	6
20	HK3L5	1,72E+06	1,02E-03	6,01E-10	6
30	HA2L5	2,49E+06	1,36E-03	6,12E-10	6
36	HK2L5 (Lys-)	1,93E+06	1,13E-03	6,17E-10	5
41	HK2L6 (Lys-)	1,87E+06	1,15E-03	6,20E-10	3
14	HK2L4	1,89E+06	1,17E-03	6,34E-10	6
13	HK2L3	1,62E+06	1,09E-03	6,82E-10	6
35	HK2L4 (Lys-)	1,81E+06	1,27E-03	7,15E-10	5
28	HA2L3	1,95E+06	1,37E-03	7,27E-10	6
29	HA2L4	2,33E+06	1,69E-03	7,38E-10	6
19	HK3L4	1,61E+06	1,20E-03	7,55E-10	6
38	HK3L4 (Lys-)	1,86E+06	1,24E-03	7,60E-10	5
42	HK3L6 (Lys-)	1,51E+06	1,14E-03	7,66E-10	3
33	HA2L5 (Lys-)	2,01E+06	1,50E-03	7,76E-10	3
32	HA2L4 (Lys-)	2,43E+06	1,62E-03	8,30E-10	5
40	HA2L6 (Lys-)	1,83E+06	1,51E-03	8,38E-10	3

N.º	Constructo de HL	ka (promediada)	kd (promediada)	KD (promediada)	N
18	HK3L3	1,22E+06	1,04E-03	8,97E-10	6
17	HK3L2	1,13E+06	1,45E-03	1,29E-09	4
12	HK2L2	1,23E+06	1,57E-03	1,38E-09	4
27	HA2L2	1,63E+06	2,22E-03	1,41E-09	4
16	HK3L1	7,83E+05	1,33E-03	1,76E-09	4
26	HA2L1	9,49E+05	1,66E-03	1,76E-09	4
10	HK1L5	2,72E+06	4,89E-03	1,78E-09	3
11	HK2L1	8,75E+05	1,60E-03	1,84E-09	4
9	HK1L4	2,78E+06	1,18E-02	4,34E-09	2
8	HK1L3	3,71E+06	1,96E-02	4,87E-09	2
25	HA1L5	6,36E+06	4,52E-02	7,20E-09	2
24	HA1L4	1,18E+07	1,13E-01	9,54E-09	1
23	HA1L3	3,57E+07	5,24E-01	1,47E-08	1
22	HA1L2	6,49E+05	1,22E-02	1,86E-08	2
21	HA1L1	6,15E+04	2,79E-02	4,53E-07	1

Ejemplo 4: Prueba farmacológica *in vivo* que emplea el anticuerpo anti-Notch4 humano (efecto antitumoral y efecto supresor de la perfusión sanguínea del Anticuerpo B en un modelo de xenoinjerto Calu6)

- 5 Se preparó una línea celular humana de cáncer pulmonar no microcítico Calu6 (número de ATCC HTB-56) cultivada en un medio de cultivo EMEM que comprendía un 10% de FBS, aminoácidos no esenciales MEM, piruvato de sodio y penicilina/estreptomicina para obtener una concentración de 1.6×10^8 células/mL con medio de cultivo EMEM, y se mezcló con Matrigel™ (N.º de cat. CORNING 354234) con una proporción de 1:1 para preparar una suspensión celular de 8.0×10^7 células/mL. Se trasplantó por vía subcutánea una dosis de 0.1 mL en la región dorsal posterior derecha de ratones atímicos de 6 semanas de edad (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, hembra, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) Veintiocho días después del trasplante, se midieron los ejes mayor y menor del tumor con un calibre digital electrónico (calibre DIGIMATIC™, Mitsutoyo Corporation) y se calculó el volumen tumoral TV con la siguiente fórmula de cálculo.

15
$$TV \text{ (mm}^3\text{)} = \text{Eje mayor (mm)} \times \text{Eje menor (mm)} \times \text{Eje menor (mm)} / 2$$

La aleatorización se llevó a cabo basándose en el volumen tumoral del primer día de administración de modo que el valor promedio de los volúmenes tumorales será aproximadamente igual entre los grupos. El Anticuerpo B se diluyó inmediatamente antes de su administración de modo que la solución de vehículo (histidina 25 mM, sacarosa 250 mM y Tween80 al 0.05% (pH5.3)) y la solución salina están en una proporción de 1:9 para obtener 0.1, 0.3 y 1.0 mg/mL de las muestras para evaluación (1, 3 y 10 mg/kg para el grupo de administración, respectivamente). Las muestras para evaluación se administraron mediante una inyección en la vena de la cola con una dosis de 0.2 mL/20 g de peso corporal del ratón dos veces a la semana (Día 1 y Día 4 cuando se cuenta el día de agrupación como Día 1). Para el grupo de control, se diluyeron 11.6 mg/mL de IgG de control (IgG humana ChromPure, molécula entera, Jackson ImmunoResearch Laboratories, N.º de cat. 009-000-003) con PBS para obtener 1.0 mg/mL, y se administraron mediante una inyección en la vena de la cola con una dosis de 0.2 mL/20 g de peso corporal del ratón (volumen de administración 10 mg/kg). El experimento se llevó a cabo con 8 ratones por grupo. Se calculó el volumen tumoral relativo RTV para cada uno de entre el grupo de IgG de control y el grupo de administración de Anticuerpo B con la siguiente fórmula y se muestra en la Figura 2A.

30
$$RTV = \text{Volumen tumoral en el día de la medición} / \text{Volumen tumoral en el inicio de la administración}$$

El Anticuerpo B mostró un efecto antitumoral significativo con todas las dosis en el modelo de xenoinjerto de Calu6.

- 35 Se evaluó la perfusión sanguínea en el tumor determinando la fluorescencia mediante la tinción del núcleo de células alrededor de los vasos sanguíneos debida a un tinte fluorescente (Hoechst) inyectado en la vena de la cola (Funahashi *et al.* (2014), *Cancer Sci.*, 105(10), 1334-42.). Después de medir el diámetro del tumor en el último día de la prueba, se diluyeron 10 mg/mL de Hoechst 33342 (N.º de cat. de Life technologies H3570) hasta 2 x con PBS, y se inyectaron

5.0 mg/mL de Hoechst 33342 diluido en la vena de la cola con una dosis de 0.1 mL/cabeza. Los ratones se sometieron a eutanasia mediante una dislocación cervical 5 minutos después de la inyección de Hoechst, y los tumores recolectados se embebieron en compuesto OCT (N.º de cat. de Sakura Finetek Japan Co., Ltd. 4583) para producir bloques congelados.

Los vasos sanguíneos de los tumores de las secciones congeladas se sometieron a una tinción inmunofluorescente con un anticuerpo anti-CD31 (conjugado con FITC, N.º de cat. de BD Pharmingen 553372) y la fluorescencia de Hoechst de los puntos principales de los vasos sanguíneos de los tumores (5 por tumor) se fotografió con un microscopio de fluorescencia BIOREVO (KEYENCE, BZ-9000). Se determinó el área positiva de Hoechst con un software de análisis de imágenes (Lumina Vision ver 2.2.2, MITANI CORPORATION) y se calculó el promedio de cada sección tumoral, que se muestra en la Figura 2B.

El Anticuerpo B mostró un efecto supresor de la perfusión sanguínea significativo con todas las dosis en el modelo de xenoinjerto de Calu6.

Ejemplo 5: Uso combinado del Anticuerpo B y cisplatino en un modelo de xenoinjerto de Calu6

Se preparó una línea celular humana de cáncer pulmonar no microcítico Calu6 (número de ATCC HTB-56) cultivada en un medio de cultivo EMEM que comprendía un 10% de FBS y penicilina/estreptomicina para obtener una concentración de 1.2×10^8 células/mL con medio de cultivo EMEM, y se mezcló con Matrigel™ (N.º de cat. CORNING 354234) con una proporción de 1:1 para preparar una suspensión celular de 6.0×10^7 células/mL. Se trasplantó por vía subcutánea una dosis de 0.1 mL en la región dorsal posterior derecha de ratones atímicos de 7 semanas de edad (CAnN. Cg-Foxn1nu/CrJCrJ, hembra, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) Veintisiete días después del trasplante, se midieron los ejes mayor y menor del tumor con un calibre digital electrónico (calibre DIGIMATIC™, Mitsutoyo Corporation) y se calculó el volumen tumoral TV con la siguiente fórmula de cálculo.

$$\text{Volumen tumoral TV (mm}^3\text{)} = \text{Eje mayor (mm)} \times \text{Eje menor (mm)} \times \text{Eje menor (mm)} / 2$$

La aleatorización se llevó a cabo basándose en el volumen tumoral del primer día de administración de modo que el valor promedio de los volúmenes tumorales será aproximadamente igual entre los grupos. Para el Anticuerpo B, se diluyó una solución de 10.34 mg/mL (vehículo: fosfato 25 mM, trealosa 200 mM y Tween80 al 0.05% (pH 5.5)) inmediatamente antes de la administración con PBS para preparar una solución de 2.5 mg/mL, y esta se administró mediante una inyección intravenosa con una dosis de 0.2 mL (500 µg)/cabeza, dos veces a la semana durante 5 semanas. El cisplatino se administró una vez el primer día de administración mediante una administración en la vena de la cola con una dosis de 10 mg/kg. El experimento se llevó a cabo con 4 ratones por grupo. El volumen tumoral relativo RTV se calculó para cada uno de entre el grupo de control (no tratado), el grupo de administración de Anticuerpo B, el grupo de administración de cisplatino y el grupo combinado de Anticuerpo B + cisplatino con la siguiente fórmula y se muestra en la Figura 3.

$$\text{RTV} = \text{Volumen tumoral en el día de la medición} / \text{Volumen tumoral en el inicio de la administración}$$

El uso combinado de Anticuerpo B y cisplatino mostró un efecto antitumoral significativamente superior en comparación con el cisplatino solo en el modelo de xenoinjerto de Calu6.

Ejemplo 6: Uso combinado del Anticuerpo B y mesilato de lenvatinib en un modelo de xenoinjerto de FTC238

Se preparó una línea celular humana de cáncer de tiroides FTC238 (adquirida de Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.) cultivada en un medio de cultivo DMEM/HAM's F12 (1:1) que comprendía un 10% de FBS y penicilina/estreptomicina para obtener una concentración de 1.2×10^8 células/mL con medio de cultivo DMEM/HAM's F12 (1:1), y se mezcló con Matrigel™ (N.º de cat. de CORNING 354234) con una proporción de 1:1 para preparar una suspensión celular de 6.0×10^7 células/mL. Se trasplantó por vía subcutánea una dosis de 0.1 mL en el flanco derecho de ratones atímicos de 7 semanas de edad (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrJCrJ, hembra, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.). Ocho días después del trasplante, se midieron los ejes mayor y menor del tumor con un calibre digital electrónico (calibre DIGIMATIC™, Mitsutoyo Corporation) y se calculó el volumen tumoral TV con la siguiente fórmula de cálculo.

$$\text{Volumen tumoral TV (mm}^3\text{)} = \text{Eje mayor (mm)} \times \text{Eje menor (mm)} \times \text{Eje menor (mm)} / 2$$

La aleatorización se llevó a cabo basándose en el volumen tumoral del primer día de administración de modo que el valor promedio de los volúmenes tumorales será aproximadamente igual entre los grupos. Para el Anticuerpo B, se diluyeron 10.8 mg/mL de Anticuerpo B (vehículo: histidina 25 mM y sacarosa 250 mM (pH 5.3)) inmediatamente antes de la administración con la solución de vehículo para preparar 2.5 mg/mL de Anticuerpo B, y esto se administró mediante una inyección en la vena de la cola con una dosis de 0.2 mL (500 µg)/cabeza, dos veces a la semana durante 2 semanas. El mesilato de lenvatinib se administró por vía oral con una dosis de 10 mg/kg, una vez al día durante 12 días. El experimento se llevó a cabo con 5 ratones por grupo. El volumen tumoral relativo RTV se calculó para cada uno de entre el grupo de control (no tratado), el grupo de administración de Anticuerpo B, el grupo de administración

de mesilato de lenvatinib y el grupo combinado de Anticuerpo B + mesilato de lenvatinib con la siguiente fórmula y se muestra en la Figura 4.

RTV = Volumen tumoral en el día de la medición / Volumen tumoral en el inicio de la administración

El uso combinado de Anticuerpo B y mesilato de lenvatinib mostró un efecto antitumoral significativamente superior en comparación con el Anticuerpo B administrado solo o el mesilato de lenvatinib administrado solo en el modelo de xenoinjerto de FTC238.

Ejemplo 7: Uso combinado del anticuerpo de ratón 6-3-A6 y paclitaxel en un modelo de xenoinjerto de DU145

Se preparó una línea celular humana de cáncer de próstata DU145 (número de ATCC HTB-81) cultivada en un medio de cultivo RPMI1640 que comprendía un 10% de FBS, piruvato de sodio, 2-mercaptoetanol, y penicilina/estreptomicina para obtener una concentración de 6.0×10^7 células/mL con medio de cultivo RPMI1640. Se trasplantó por vía subcutánea una dosis de 0.1 mL en el flanco derecho de ratones atímicos de 6 semanas de edad (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, hembra, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.). Veinticuatro días después del trasplante, se midieron los ejes mayor y menor del tumor con un calibre digital electrónico (calibre DIGIMATIC™, Mitsutoyo Corporation) y se calculó el volumen tumoral TV con la siguiente fórmula de cálculo.

Volumen tumoral TV (mm^3) = Eje mayor (mm) x Eje menor (mm) x Eje menor (mm) / 2

La aleatorización se llevó a cabo basándose en el volumen tumoral del primer día de administración de modo que el valor promedio de los volúmenes tumorales será aproximadamente igual entre los grupos. Para 6-3-A6, se diluyeron 5.11 mg/mL de 6-3-A6 (vehículo: PBS) inmediatamente antes de la administración con PBS para preparar 2.5 mg/mL de 6-3-A6, y esto se administró mediante una inyección en la vena de la cola con una dosis de 0.2 mL (500 μg)/cabeza, dos veces a la semana durante 4 semanas. El paclitaxel se administró mediante una administración en la vena de la cola con una dosis de 20 mg/kg, una vez al día durante 5 días. El experimento se llevó a cabo con 4 ratones por grupo. El volumen tumoral TV de cada uno de entre el grupo de control (no tratado), el grupo de administración de 6-3-A6, el grupo de administración de paclitaxel y el grupo combinado de 6-3-A6 + paclitaxel se muestra en la Figura 5.

El uso combinado de 6-3-A6 y paclitaxel mostró un efecto antitumoral significativamente superior en comparación con 6-3-A6 solo o paclitaxel solo en el modelo de xenoinjerto de DU145.

Ejemplo 8: Combinación de Anticuerpo B con mesilato de lenvatinib en un modelo de xenoinjerto derivado de un paciente con carcinoma hepatocelular

Para examinar el efecto antitumoral del Anticuerpo B sobre un carcinoma hepatocelular (HCC), se utilizó LI0050, un modelo de xenoinjerto derivado de un paciente HuPrime® (Crown Bioscience Inc.). LI0050 es un ratón modelo al cual se le han inoculado tejidos tumorales primarios procedentes de un paciente hembra con HCC, que se ha descrito que es resistente a sorafenib (panfleto de Patente Internacional WO2015/031604).

Se recolectaron fragmentos tumorales procedentes de ratones en stock LI0050 y se inoculó un fragmento de 2-4 mm de diámetro por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones atímicos BALB/c para desarrollar el tumor. El tamaño del tumor se midió en dos dimensiones utilizando un calibre y el volumen tumoral TV se calculó con la siguiente fórmula de cálculo.

Volumen tumoral TV (mm^3) = Eje mayor (mm) x Eje menor (mm) x Eje menor (mm) / 2

El tratamiento se inició cuando el tamaño del tumor promedio alcanzó aproximadamente 192 mm^3 . La aleatorización se llevó a cabo basándose en el volumen tumoral del primer día de administración de modo que el valor promedio de los volúmenes tumorales será aproximadamente igual entre los grupos. Cada grupo estaba constituido por 10 ratones. El día de la aleatorización se consideró como el Día 0. Desde el Día 0 hasta el Día 13, los ratones de cada grupo se trataron una vez al día con cada uno de los siguientes (i) control (HCl 3 mM), (ii) mesilato de lenvatinib (10 mg/kg), (iii) tosilato de sorafenib (30 mg/kg) o (iv) mesilato de lenvatinib (10 mg/kg) más Anticuerpo B (0.5 mg/ratón).

Para realizar una comparación entre dos grupos, se ha utilizado una prueba t de muestras independientes.

La combinación de Anticuerpo B y mesilato de lenvatinib mostró un efecto antitumoral significativamente superior en comparación con el grupo de control.

Ejemplo 9: Comparación de la actividad inhibitoria de la señal entre un anticuerpo policlonal anti-Notch4 humano y el Anticuerpo B

A continuación, se compararon las actividades inhibitorias de la señal de un anticuerpo anti-Notch4 humano policlonal (Santa Cruz, SC8643, en lo sucesivo N-17) y el Anticuerpo B con un sistema de ensayo marcador de luciferasa Notch4-GAL4.

Se empleó Slide-A-Lyzer (Thermo scientific, 66333) para realizar una diálisis a 4 °C durante 8 horas en PBS con el fin de eliminar la azida sódica contenida en N-17. Después de concentrar la solución de N-17 dializada con Amicon Ultra (Millipore, UFC503096), la concentración se midió con un microespectrofotómetro (Nano Drop, Thermo).

Se disolvió DLL4 humano recombinante (R&D Systems, 1506-D4-050/CF) en PBS para preparar una solución de 10 µg/mL (en lo sucesivo en la presente solución de DLL4). En una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano (Greiner, 655083), se dispensaron 50 µL/pocillo (500 ng/pocillo) de la solución de DLL4 y 50 µL/pocillo de PBS para los pocillos no estimulados, y esto se dejó reposar durante toda la noche a 4 °C para permitir que DLL4 pasara a fase sólida en la placa blanca de 96 pocillos. Las células marcadoras se suspendieron en un medio de cultivo de D-MEM que comprendía un 10% de suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomicina para preparar una suspensión celular con una densidad de 1×10^5 /mL. Cada pocillo con DLL4 en fase sólida se lavó tres veces con PBS y se sembraron 50 µL/pocillo (5000 células/pocillo) de la suspensión celular. Después de la diálisis/concentración, las diluciones de N-17 o diluciones de Anticuerpo B con el medio de cultivo (concentraciones finales: 0, 0.01, 0.1, 1 y 10 µg/mL) se añadieron cada una en una cantidad de 50 µL y esto se cultivó a 37 °C durante 22 horas. La actividad de luciferasa de las células marcadoras se evaluó con el sistema de ensayo Steady-Glo (Promega, E2510) como se indica a continuación.

Se añadieron cien microlitros de solución Steady-Glo a cada pocillo, después se cultivaron, agitaron y a continuación se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la luminiscencia con un lector de placas Multilabel (Envision 2102-0020, Perkin Elmer). Se calculó la luminiscencia relativa a partir del valor de luminiscencia medido utilizando la siguiente fórmula.

Luminiscencia relativa (%) = (Intensidad de luminiscencia del pocillo de la muestra - Intensidad de luminiscencia promedio de los pocillos no estimulados) / (Intensidad de luminiscencia promedio de los pocillos de control - Intensidad de luminiscencia promedio de los pocillos no estimulados)

La correlación entre la concentración de Anticuerpo B y el valor de luminiscencia relativa (%) se muestra en la Figura 7. La gráfica de la Figura 7 muestra el valor promedio de los resultados de tres pruebas independientes y la barra de error muestra la desviación estándar de estos. Se confirmó la actividad inhibitoria de la señal para el Anticuerpo B, pero para N-17 no se observó actividad inhibitoria de la señal de Notch4 por parte de N-17 en el intervalo de concentraciones investigado.

Ejemplo 10: Análisis cinético de la unión entre el Anticuerpo B y el dominio NRR de Notch humano soluble recombinante

Se llevó a cabo un análisis cinético utilizando BIAcore T100 para la interacción entre el dominio NRR de isotipos de Notch humano (Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4) y el Anticuerpo B. El Anticuerpo B se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de una línea celular CHO de expresión estable del Anticuerpo B con el uso secuencial de cromatografía de afinidad con proteína A, cromatografía de intercambio aniónico Capto Q y cromatografía de intercambio catiónico UNOsphere S. Se crearon proteínas de fusión del dominio NRR de Notch1 humano (N.º de acceso de Genbank 017617; posiciones de la secuencia 1307-1733), dominio NRR de Notch2 humano (N.º de acceso de Genbank 024408; posiciones de la secuencia 1239-1650), dominio NRR de Notch3 humano (N.º de acceso de Genbank 000435; posiciones de la secuencia 1246-1641) y dominio NRR de Notch4 humano (N.º de acceso de Genbank NP_004548.3; posiciones de la secuencia 1046-1445) con fosfatasa alcalina secretora (SEAP), una marca de hemaglutinina (HA) y una marca de histidina (x 10), y estas se purificaron con una columna de flujo rápido HisTrap™ (GE Healthcare). La interacción entre el Anticuerpo B y el dominio NRR de cada uno de los isotipos de Notch humano se midió con el siguiente método. El Anticuerpo B purificado fue capturado por un anticuerpo Fc anti-IgG humana fijado sobre un chip sensor CM5 (GE Healthcare). El dominio NRR purificado de cada uno de los isotipos de Notch humano se inyectó sobre el chip sensor con 6 concentraciones diferentes, y se observó la interacción y disociación con el anticuerpo mediante operación manual.

El sensograma de interacción superpuesto y los parámetros cinéticos calculados se muestran cada uno de ellos en la Figura 8 y la Tabla 32.

Tabla 32.

Parámetros cinéticos calculados de la interacción entre el Anticuerpo B y las proteínas de fusión de Notch4 humano-NRR			
Muestra	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
Notch1 humano-NRR-SEAP-HA-His	ND	ND	ND
Notch2 humano-NRR-SEAP-HA-His	ND	ND	ND
Notch3 humano-NRR-SEAP-HA-His	ND	ND	ND

Parámetros cinéticos calculados de la interacción entre el Anticuerpo B y las proteínas de fusión de Notch4 humano-NRR			
Muestra	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
Notch4 humano-NRR-SEAP-HA-His	2,72E+04	8,31E-04	3,05E-08

LISTA DE SECUENCIAS

5	
	[0.114]
	<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.
	<120> ANTICUERPO ANTI-NOTCH4 HUMANO
	<130> ESAP1402F
10	<150> US 62/148,253
	<151> 2015-04-16
	<160> 65
	<170> PatentIn versión 3.5
	<210> 1
15	<211> 2003
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 1

ES 2 818 184 T3

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

ES 2 818 184 T3

165								170				175			
Gln	Ile	Gln	Cys	His	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Glu	Gly	His	Ala	Cys	Glu
			180					185					190		
Arg	Asp	Val	Asn	Glu	Cys	Phe	Gln	Asp	Pro	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Gly
		195					200					205			
Thr	Ser	Cys	His	Asn	Thr	Leu	Gly	Ser	Phe	Gln	Cys	Leu	Cys	Pro	Val
	210					215					220				
Gly	Gln	Glu	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Leu	Arg	Ala	Gly	Pro	Cys	Pro	Pro
225					230					235					240
Arg	Gly	Cys	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Gln	Leu	Met	Pro	Glu	Lys	Asp
				245					250					255	
Ser	Thr	Phe	His	Leu	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Ile	Gly	Pro	Asp
			260					265					270		
Cys	Glu	Val	Asn	Pro	Asp	Asn	Cys	Val	Ser	His	Gln	Cys	Gln	Asn	Gly
		275					280					285			
Gly	Thr	Cys	Gln	Asp	Gly	Leu	Asp	Thr	Tyr	Thr	Cys	Leu	Cys	Pro	Glu
	290					295					300				
Thr	Trp	Thr	Gly	Trp	Asp	Cys	Ser	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Glu	Thr
305					310					315					320
Gln	Gly	Pro	Pro	His	Cys	Arg	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Gln	Asn	Ser	Ala
				325					330					335	
Gly	Ser	Phe	His	Cys	Val	Cys	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gly	Thr	Ser	Cys
			340					345					350		
Glu	Glu	Asn	Leu	Asp	Asp	Cys	Ile	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Pro	Gly	Ser
		355					360					365			
Thr	Cys	Ile	Asp	Arg	Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly
	370					375					380				
Arg	Thr	Gly	Leu	Leu	Cys	His	Leu	Glu	Asp	Met	Cys	Leu	Ser	Gln	Pro
385					390					395					400
Cys	His	Gly	Asp	Ala	Gln	Cys	Ser	Thr	Asn	Pro	Leu	Thr	Gly	Ser	Thr
				405					410					415	

ES 2 818 184 T3

Leu Cys Leu Cys Gln Pro Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Cys His Gln Asp
 420 425 430

Leu Asp Glu Cys Leu Met Ala Gln Gln Gly Pro Ser Pro Cys Glu His
 435 440 445

Gly Gly Ser Cys Leu Asn Thr Pro Gly Ser Phe Asn Cys Leu Cys Pro
 450 455 460

Pro Gly Tyr Thr Gly Ser Arg Cys Glu Ala Asp His Asn Glu Cys Leu
 465 470 475 480

Ser Gln Pro Cys His Pro Gly Ser Thr Cys Leu Asp Leu Leu Ala Thr
 485 490 495

Phe His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Gln Leu Cys Glu Val
 500 505 510

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 818 184 T3

Gln	Arg	Ser 675	Ser	Cys	Val	Cys	Asp 680	Val	Gly	Trp	Thr	Gly 685	Pro	Glu	Cys
Glu	Ala 690	Glu	Leu	Gly	Gly	Cys 695	Ile	Ser	Ala	Pro	Cys 700	Ala	His	Gly	Gly
Thr 705	Cys	Tyr	Pro	Gln	Pro 710	Ser	Gly	Tyr	Asn	Cys 715	Thr	Cys	Pro	Thr	Gly 720
Tyr	Thr	Gly	Pro	Thr	Cys 725	Ser	Glu	Glu	Met 730	Thr	Ala	Cys	His	Ser 735	Gly
Pro	Cys	Leu	Asn 740	Gly	Gly	Ser	Cys 745	Asn	Pro	Ser	Pro	Gly	Gly 750	Tyr	Tyr
Cys	Thr	Cys 755	Pro	Pro	Ser	His	Thr 760	Gly	Pro	Gln	Cys	Gln 765	Thr	Ser	Thr
Asp 770	Tyr	Cys	Val	Ser	Ala	Pro 775	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly 780	Thr	Cys	Val	Asn
Arg 785	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser 790	Cys	Leu	Cys	Ala	Met 795	Gly	Phe	Gln	Gly	Pro 800
Arg	Cys	Glu	Gly	Lys 805	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys 810	Ala	Asp	Ser	Pro	Cys 815	Arg
Asn	Arg	Ala	Thr 820	Cys	Gln	Asp	Ser 825	Pro	Gln	Gly	Pro	Arg	Cys 830	Leu	Cys
Pro	Thr	Gly 835	Tyr	Thr	Gly	Gly	Ser 840	Cys	Gln	Thr	Leu	Met 845	Asp	Leu	Cys
Ala 850	Gln	Lys	Pro	Cys	Pro	Arg 855	Asn	Ser	His	Cys	Leu 860	Gln	Thr	Gly	Pro
Ser 865	Phe	His	Cys	Leu	Cys 870	Leu	Gln	Gly	Trp	Thr 875	Gly	Pro	Leu	Cys	Asn 880
Leu	Pro	Leu	Ser	Ser 885	Cys	Gln	Lys	Ala	Ala 890	Leu	Ser	Gln	Gly	Ile 895	Asp
Val	Ser	Ser	Leu 900	Cys	His	Asn	Gly	Gly 905	Leu	Cys	Val	Asp 910	Ser	Gly	Pro
Ser	Tyr	Phe 915	Cys	His	Cys	Pro	Pro 920	Gly	Phe	Gln	Gly	Ser 925	Leu	Cys	Gln

ES 2 818 184 T3

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

ES 2 818 184 T3

1160		1165		1170
Gly Ala Lys Gly Cys Glu Gly Arg Ser Gly Asp Gly Ala Cys Asp 1175 1180 1185				
Ala Gly Cys Ser Gly Pro Gly Gly Asn Trp Asp Gly Gly Asp Cys 1190 1195 1200				
Ser Leu Gly Val Pro Asp Pro Trp Lys Gly Cys Pro Ser His Ser 1205 1210 1215				
Arg Cys Trp Leu Leu Phe Arg Asp Gly Gln Cys His Pro Gln Cys 1220 1225 1230				
Asp Ser Glu Glu Cys Leu Phe Asp Gly Tyr Asp Cys Glu Thr Pro 1235 1240 1245				
Pro Ala Cys Thr Pro Ala Tyr Asp Gln Tyr Cys His Asp His Phe 1250 1255 1260				
His Asn Gly His Cys Glu Lys Gly Cys Asn Thr Ala Glu Cys Gly 1265 1270 1275				
Trp Asp Gly Gly Asp Cys Arg Pro Glu Asp Gly Asp Pro Glu Trp 1280 1285 1290				
Gly Pro Ser Leu Ala Leu Leu Val Val Leu Ser Pro Pro Ala Leu 1295 1300 1305				
Asp Gln Gln Leu Phe Ala Leu Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Leu 1310 1315 1320				
Arg Val Gly Leu Trp Val Arg Lys Asp Arg Asp Gly Arg Asp Met 1325 1330 1335				
Val Tyr Pro Tyr Pro Gly Ala Arg Ala Glu Glu Lys Leu Gly Gly 1340 1345 1350				
Thr Arg Asp Pro Thr Tyr Gln Glu Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gln 1355 1360 1365				
Pro Leu Gly Lys Glu Thr Asp Ser Leu Ser Ala Gly Phe Val Val 1370 1375 1380				
Val Met Gly Val Asp Leu Ser Arg Cys Gly Pro Asp His Pro Ala 1385 1390 1395				

ES 2 818 184 T3

Ser	Arg	Cys	Pro	Trp	Asp	Pro	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala
1400						1405					1410			
Ala	Met	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Leu	Glu	Pro	Leu	Leu	Pro	Gly	Pro
1415						1420					1425			
Leu	Leu	Ala	Val	His	Pro	His	Ala	Gly	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Asn
1430						1435					1440			
Gln	Leu	Pro	Trp	Pro	Val	Leu	Cys	Ser	Pro	Val	Ala	Gly	Val	Ile
1445						1450					1455			
Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Leu	Gln	Leu	Ile	Arg	Arg
1460						1465					1470			
Arg	Arg	Arg	Glu	His	Gly	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Gly	Phe	Thr
1475						1480					1485			
Arg	Arg	Pro	Arg	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	His	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro
1490						1495					1500			
Leu	Gly	Glu	Asp	Ser	Ile	Gly	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Lys	Ala
1505						1510					1515			
Glu	Val	Asp	Glu	Asp	Gly	Val	Val	Met	Cys	Ser	Gly	Pro	Glu	Glu
1520						1525					1530			
Gly	Glu	Glu	Val	Gly	Gln	Ala	Glu	Glu	Thr	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr
1535						1540					1545			
Cys	Gln	Leu	Trp	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Ala	Leu	Pro	Gln
1550						1555					1560			
Ala	Ala	Met	Leu	Thr	Pro	Pro	Gln	Glu	Ser	Glu	Met	Glu	Ala	Pro
1565						1570					1575			
Asp	Leu	Asp	Thr	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	Val	Thr	Pro	Leu	Met	Ser
1580						1585					1590			
Ala	Val	Cys	Cys	Gly	Glu	Val	Gln	Ser	Gly	Thr	Phe	Gln	Gly	Ala
1595						1600					1605			
Trp	Leu	Gly	Cys	Pro	Glu	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Leu	Asp	Gly	Gly
1610						1615					1620			
Ala	Cys	Pro	Gln	Ala	His	Thr	Val	Gly	Thr	Gly	Glu	Thr	Pro	Leu
1625						1630					1635			

ES 2 818 184 T3

His Leu	Ala Ala Arg Phe Ser	Arg Pro Thr Ala Ala	Arg Arg Leu
1640	1645	1650	
Leu Glu	Ala Gly Ala Asn Pro	Asn Gln Pro Asp Arg	Ala Gly Arg
1655	1660	1665	
Thr Pro	Leu His Ala Ala Val	Ala Ala Asp Ala Arg	Glu Val Cys
1670	1675	1680	
Gln Leu	Leu Leu Arg Ser Arg	Gln Thr Ala Val Asp	Ala Arg Thr
1685	1690	1695	
Glu Asp	Gly Thr Thr Pro Leu	Met Leu Ala Ala Arg	Leu Ala Val
1700	1705	1710	
Glu Asp	Leu Val Glu Glu Leu	Ile Ala Ala Gln Ala	Asp Val Gly
1715	1720	1725	
Ala Arg	Asp Lys Trp Gly Lys	Thr Ala Leu His Trp	Ala Ala Ala
1730	1735	1740	
Val Asn	Asn Ala Arg Ala Ala	Arg Ser Leu Leu Gln	Ala Gly Ala
1745	1750	1755	
Asp Lys	Asp Ala Gln Asp Asn	Arg Glu Gln Thr Pro	Leu Phe Leu
1760	1765	1770	
Ala Ala	Arg Glu Gly Ala Val	Glu Val Ala Gln Leu	Leu Leu Gly
1775	1780	1785	
Leu Gly	Ala Ala Arg Glu Leu	Arg Asp Gln Ala Gly	Leu Ala Pro
1790	1795	1800	
Ala Asp	Val Ala His Gln Arg	Asn His Trp Asp Leu	Leu Thr Leu
1805	1810	1815	
Leu Glu	Gly Ala Gly Pro Pro	Glu Ala Arg His Lys	Ala Thr Pro
1820	1825	1830	
Gly Arg	Glu Ala Gly Pro Phe	Pro Arg Ala Arg Thr	Val Ser Val
1835	1840	1845	
Ser Val	Pro Pro His Gly Gly	Gly Ala Leu Pro Arg	Cys Arg Thr
1850	1855	1860	
Leu Ser	Ala Gly Ala Gly Pro	Arg Gly Gly Gly Ala	Cys Leu Gln
1865	1870	1875	

Ala	Arg	Thr	Trp	Ser	Val	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Ala
1880						1885					1890			
Tyr	Ser	His	Cys	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly
1895						1900					1905			
Pro	Thr	Pro	Arg	Gly	Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Gly	Met	Arg	Gly	Pro
1910						1915					1920			
Arg	Pro	Asn	Pro	Ala	Ile	Met	Arg	Gly	Arg	Tyr	Gly	Val	Ala	Ala
1925						1930					1935			
Gly	Arg	Gly	Gly	Arg	Val	Ser	Thr	Asp	Asp	Trp	Pro	Cys	Asp	Trp
1940						1945					1950			
Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Cys	Gly	Ser	Ala	Ser	Asn	Ile	Pro	Ile	Pro
1955						1960					1965			
Pro	Pro	Cys	Leu	Thr	Pro	Ser	Pro	Glu	Arg	Gly	Ser	Pro	Gln	Leu
1970						1975					1980			
Asp	Cys	Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Gln	Glu	Met	Pro	Ile	Asn	Gln	Gly
1985						1990					1995			

Gly Glu Gly Lys Lys
2000

5	<210> 2	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 2	
10	acatcactcc gt	12
	<210> 3	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 3	
	acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct	50
	<210> 4	
	<211> 26	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 4	
25	agctacgctg aagtatcaac gcagag	26

5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 5
 gccagtggat agactgatgg 20
 10 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 6
 15 gatggataca gttggtgcag c 21
 <210> 7
 <211> 115
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala
 115
 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 8

ES 2 818 184 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 345

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 9

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggaggggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tgcgcagact 120

ccagacaaga ggctggagtt ggtcgcaacc attaatagta atgggtgtag aacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagaccag 300

ggttttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 10

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 10

ES 2 818 184 T3

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggatatca acagaaacca 120
 gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagct atccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 11

<211> 441

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 11

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

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

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

ES 2 818 184 T3

Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Asp	Gln	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr		
			100					105					110				
Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro		
		115					120					125					
Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val		
	130					135					140						
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala		
145					150					155					160		
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly		
			165						170					175			
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly		
			180					185					190				
Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys		
	195						200					205					
Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys		
	210					215					220						
Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys		
225					230					235					240		
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val		
				245					250					255			
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr		
			260					265					270				
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu		
		275					280					285					
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His		
	290					295					300						
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln		
				325					330					335			

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

ES 2 818 184 T3

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13

<211> 1326

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 13

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagggc ttagtgcagc ctggaggggtc cctgaaactc 60
tccctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tgcgcagact 120
ccagacaaga ggctggagtt ggtcgcaacc attaatagta atgggtggtag aacctattat 180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaataga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagaccag 300
ggtttttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgcagctag cacaaaaggc 360
ccctctgtct tccctctggc tccctgtctc cgctccacct ccgagtccac tgcgctctg 420
ggctgtctgg tcaaggatta cttccctgag ccagtcactg tgagttggaa ctgaggcgcc 480
ctgaccagcg gagtccacac atttcccgt gtgctgcaga gtcgggctt gtactccctg 540
tctagtgtgg tcaccgtgcc ttcaagcaat ttggggactc agacctatac atgcaacgtg 600
gaccataagc catctaatac taaggctgat aaaaccgtgg agcgaaaatg ctgcgtggaa 660
tgcccacctt gtccctgtcc accagccgt gcaccaagcg tgttcctgtt tctccaaag 720
cccaaagaca cactgatgat cagcagaact cctgaggtca cctgcgtgggt cgtggacgtg 780
tcccacgagg atcccgaagt ccagtttaac tggtagctgg atggggtcga agtgcataat 840
gcaaagacta aacctcggga ggaacagttc aactctacct ttagagtcgt gagtgtgctg 900
acagtcgtgc accaggactg gctgaacgga aaggagtata agtgcaaagt gtctaataag 960
ggcctgcccg cccctatcga gaaaacaatt agtaagacta aaggccagcc aagggaaccc 1020
caggtgtaca cactgcccc tagtcgagag gaaatgacaa agaaccaggt ctactgact 1080
tgtctggtga aagggttcta tccatccgac attgccgtgg agtgggaatc taatggacag 1140
cccgaaaaca attacaagac cacaccacc atgctggaca gcgatggatc cttctttctg 1200
tattcaaagc tgaccgtgga taaaagccgg tggcagcagg gcaatgtctt ttctgtctct 1260
gtgatgcacg aagccctgca caaccactac actcagaagt ccctgtccct gtctcctggc 1320
aatga 1326

5

<210> 14

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 14

	gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	60
	atcacctgca aggccagtc ggatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca	120
	gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat	180
	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct	240
	gaagacttgg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagct atccgtggac gttcggtgga	300
	ggcaccaagc tggaaatcaa acgtacggtc gccgcccct ccgtgtttat ttttcctcca	360
	tctgacgaac agctgaagag tgggaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caatttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaagtc gacaacgctc tgcagtctgg caatagtcag	480
	gagtcagtga ctgaacagga cagcaaggat tccacctatt ctctgagctc caccctgaca	540
	ctgagcaaaag cagattacga aaagcacaaa gtctatgcct gcgaagtgc ccaccagggg	600
	ctgagcagtc cagtgaccaa gtcctttaac aggggagagt gttga	645
5	<210> 15 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético <400> 15 Ser Tyr Gly Met Ser	
10	1 5 <210> 16 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220>	
15	<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético <400> 16 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser	
20	1 5 10 <210> 17 <211> 17 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético <400> 17 Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys	
25	1 5 10 15 Gly <210> 18 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético <400> 18 Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr	
35	1 5 10 <210> 19 <211> 6	

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 19
Asp Gln Gly Phe Ala Tyr
1 5
 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 20
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10
 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 21
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 22
Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5
 <210> 23
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 23
 agctatggca tgtct 15
 <210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 24
 ggattcactt tcagtagcta tggcatgtct 30
 <210> 25
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 25
 accattaata gtaatggtgg tagaacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51
 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 26
 accattaata gtaatggtgg tagaacctat 30
 <210> 27
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 27
 10 gaccagggtt ttgcttac 18
 <210> 28
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 28
 aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta gcc 33
 <210> 29
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 25 <400> 29
 tgggcatcca cccggcacac t 21
 <210> 30
 <211> 27
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 30
 35 cagcaatata gcagctatcc gtggacg 27
 <210> 31
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 31

ES 2 818 184 T3

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 345

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 32

gaggtgcagc tggtcgagag cggagggggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120

ccagggaagg gactggagta tgtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180

cctgactccg tgaaggggccg gttcactatc tctagagata acagtaagaa caccctgtac 240

ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagac atggccgtct actattgtgc aagggatcag 300

ggattcgcat actgggggaca gggaactctg gtgaccgtct caagc 345

<210> 33

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 33

ES 2 818 184 T3

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

Val Ser Ser
115

<210> 34

<211> 345

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 34

gaagtgcagc tggtcgagag cgggggaggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120

ccagggaagg gactggagct ggtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180

cctgactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagata acagtaagaa caccctgtat 240

ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagac atggccgtct actattgtgc ccgagatcag 300

gggttcgctt attggggaca ggggacactg gtgaccgtga gcagc 345

<210> 35

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 35

ES 2 818 184 T3

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 345

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 36

gaagtgcagc tggtcgagag tgggggaggc ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgccttgggt gcgccaggct 120

ccagggaaaag gactggagct ggtcgccacc atcaactcta atggaggccg aacatactat 180

cctgacagtg tgaagggccg gttcactatt agcagagata actccaaaaa taccctgtat 240

ctgcagatgg gcagcctgaa ggcagaagac atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300

gggttcgcct attgggggca ggggactctg gtcactgtct cttcc 345

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 37

ES 2 818 184 T3

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

Val Ser Ser
 115

<210> 38

<211> 345

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 38

gaagtgcagc tggtcgaatc tgggggggga ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120

cctgggaagg gactggagta tgtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180

gccaaactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagaca acagtaagaa caccctgtac 240

ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagat atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300

ggctttgctt attggggaca ggggacactg gtcaccgtct cctcc 345

<210> 39

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 39

ES 2 818 184 T3

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

Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 345

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 40

gaggtgcagc tggtcgaatc cggggggggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120

cctgggaagg gactggagct ggtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180

gccaaactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagaca acagtaagaa caccctgtat 240

ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagat atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300

ggcttcgcct actgggggca gggaacactg gtcaccgtct cctca 345

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 41

ES 2 818 184 T3

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 42

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 42

gacattcaga tgacacagag cccttcatct ctgagtgcac cagtgggaga cagggtcacc 60

atcacatgca aagccagcca ggatgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaagccc 120

gggaaagtgc ctaagctgct gatctactgg gctagtacac ggcacactgg cgtcccatcc 180

agattcagcg gctccgggtc tggaaccgac tttactctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggatgtgg ccacatacta ttgccagcag tattcatctt atccttggac cttcggacag 300

ggaacaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 43

ES 2 818 184 T3

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 44

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 44

gatattcaga tgactcagag cccctcctct ctgagtgcac cagtgggaga cagggtcacc 60

atcacatgca aagccagcca ggatgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaagccc 120

gggaaagtgc ctaagctgct gatctactgg gctagtacac ggcacactgg cgtcccatcc 180

agattcagcg gctccgggtc tggaaccgac ttactctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggatgtgg ccacatactt ctgccagcag tattcatcct atccttgac cttcggacag 300

ggaactaaag tggagattaa g 321

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 45

ES 2 818 184 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 46

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 46

gaaattgtga tgacccagtc tcccgccaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60

ctgtcttgca aggccagtcg ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaaccc 120

gggcaggctc ctcggctgct gatctattgg gcatccactc ggacacccgg cattcccgcc 180

agattctcag gcagcggggtc cggaacagag ttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240

gaagatttcg ctgtctacta ttgccagcag tattctagtt atccttggac attcggccag 300

ggaacaaaag tggaatcaa a 321

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 47

ES 2 818 184 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 48

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 48

gaaatcgtga tgacccagag ccccgcaaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60

ctgtcttgca aggccagtca ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaaccc 120

gggcaggctc ctcggtgct gatctattgg gcatccactc ggcacaccgg cattcccgcc 180

agattctcag gcagcgggtc cggaacagag tttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240

gaagatttcg ctgtctactt ttgccagcag tattcatcct atccttgagac cttcggacag 300

ggaacaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 49

ES 2 818 184 T3

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 50

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 50

gatatccaga tgacccagtc cccaagctcc ctgtccgcat ctgtgggcga cggggtcacc 60

attacatgta aagccagtca ggatgtggga acagccgtcg cttggtacca gcagaagccc 120

ggcaaatctc ctaagctgct gatctattgg gcttccacac ggcacactgg cgtgccctct 180

agattcagtg gctcagggag cggaacagac tttactctga ccatttctag tctgcagcca 240

gaggatgtgg caacttactt ctgccagcag tactcaagct atccctggac ctttggccag 300

gggacaaaag tcgaaatcaa g 321

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 51

ES 2 818 184 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 52

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 52

gaaatcgtga tgacccagag ccccgcaaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60

ctgtcttgca aggccagtca ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaacct 120

gggcagtctc ctcggtgtgct gatctattgg gcatccactc ggcacaccgg cattcccgcc 180

agattctcag gcagcgggtc cggaacagag tttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240

gaagatttcg ctgtctactt ttgccagcag tattcatcct atccttgac cttcggacag 300

ggaacaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 53

<211> 326

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 53

ES 2 818 184 T3

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

ES 2 818 184 T3

195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu 210 215 220		
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn 225 230 235 240		
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 245 250 255		
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 260 265 270		
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 275 280 285		
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 290 295 300		
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 305 310 315 320		
Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325		

<210> 54

<211> 981

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 54

ES 2 818 184 T3

```

gctagcacaa aaggccccctc tgtcttccct ctgggtccct gctcccgtc cacctccgag      60
tccactgccg ctctgggctg tctgggtcaag gattacttcc ctgagccagt cactgtgagt      120
tggaactcag gcgccctgac cagcggagtc cacacatttc ccgctgtgct gcagagctcc      180
ggcctgtact ccctgtctag tgtgggtcacc gtgccttcaa gcaatttcgg gactcagacc      240
tatacatgca acgtggacca taagccatct aatactaagg tcgataaaac cgtggagcga      300
aaatgctgcg tggaatgccc accttgtcct gctccaccag ccgctgcacc aagcgtgttc      360
ctgtttcctc caaagcccaa agacacactg atgatcagca gaactcctga ggtcacctgc      420
gtggtcgtgg acgtgtccca cgaggatccc gaagtccagt ttaactggta cgtggatggg      480
gtcgaagtgc ataatgcaaa gactaaacct cgggaggaac agttcaactc tacctttaga      540
gtcgtgagtg tgctgacagt cgtgcaccag gactggctga acggaaagga gtataagtgc      600
aaagtgtcta ataagggcct gcccgccccct atcgagaaaa caattagtaa gactaaaggc      660
cagccaaggg aaccccaggt gtacacactg cccctagtc gcgaggaaat gacaaagaac      720
caggtctcac tgacttgtct ggtgaaaggg ttctatccat ccgacattgc cgtggagtgg      780
gaatctaata gacagcccgaa aaacaattac aagaccacac caccatgct ggacagcgat      840
ggatccttct ttctgtattc aaagctgacc gtggataaaa gccggtggca gcagggcaat      900
gtcttttcct gctctgtgat gcacgaagcc ctgcacaacc actacactca gaagtccttg      960
tccctgtctc ctggcaaatg a                                          981

```

<210> 55

<211> 325

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 55

ES 2 818 184 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly

ES 2 818 184 T3

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

<210> 56
<211> 978
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético
<400> 56

ES 2 818 184 T3

gctagcaciaa aaggccccctc tgtcttccct ctggctccct gctcccgtc cacctccgag	60
tccactgccg ctctgggctg tctgggtcaag gattacttcc ctgagccagt cactgtgagt	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggagtc cacacatttc ccgctgtgct gcagagctcc	180
ggcctgtact ccctgtctag tgtgggtcacc gtgccttcaa gcaatttcgg gactcagacc	240
tatacatgca acgtggacca taagccatct aatactaagg tcgataaaac cgtggagcga	300
aaatgctgcg tggaatgcc accttgtcct gctccaccag ccgctgcacc aagcgtgttc	360
ctgtttcctc caaagcccaa agacacactg atgatcagca gaactcctga ggtcacctgc	420
gtggctcgtg acgtgtccca cgaggatccc gaagtccagt ttaactggta cgtggatggg	480
gtcgaagtgc ataatgcaaa gactaaacct cgggaggaac agttcaactc tacctttaga	540
gtcgtgagtg tgctgacagt cgtgcaccag gactggctga acggaaagga gtataagtgc	600
aaagtgtcta ataagggcct gcccgcccct atcgagaaaa caattagtaa gactaaaggc	660
cagccaaggg aaccccaggt gtacacactg cccctagtc gcgaggaaat gacaaagaac	720
caggtctcac tgacttgtct ggtgaaaggg ttctatccat ccgacattgc cgtggagtgg	780
gaatctaata gacagcccga aaacaattac aagaccacac caccatgct ggacagcgat	840
ggatccttct ttctgtattc aaagctgacc gtggataaaa gccggtggca gcagggcaat	900
gtcttttcct gctctgtgat gcacgaagcc ctgcacaacc actacactca gaagtccttg	960
tccctgtctc ctggctga	978

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 57

ES 2 818 184 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 58

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 58

cgtacggtcg ccgccccctc cgtgtttatt tttcctccat ctgacgaaca gctgaagagt 60

gggaccgcct ccgtggtgtg cctgctgaac aatttctacc cccgggaggc caaggtgcag 120

tggaaagtcg acaacgctct gcagtctggc aatagtcagg agtcagtgac tgaacaggac 180

agcaaggatt ccacctattc tctgagctcc accctgacac tgagcaaagc agattacgaa 240

aagcacaaag tctatgcctg cgaagtgacc caccaggggc tgagcagtcc agtgaccaag 300

tcctttaaca ggggagagtg ttga 324

<210> 59

<211> 1323

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 59

gaagtgcagc tggtcgaatc tgggggggggt ctggtgcagc caggcggatc cctgagactg	60
agctgcgccg cttctgggtt cacatcttcc agctacggca tgtcctgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg gactggagct ggtgagtaca atcaactcaa atgggggtcg aacttactat	180
cccgactccg tgaagggcag gttcactatt tcccgggata acagcaaaaa taccctgtac	240
ctgcagatgg ggtccctgcg agctgaagac atggcagtgt actattgtgc ccgtgatcag	300
ggtttcgctt attgggggca ggggtactctg gtcaccgtgt ctagtgttc taccaaggga	360
ccatccgtgt tccactggc accatgctcc cggagcacat ctgagagtac tgcagccctg	420
ggctgtctgg tgaaggacta tttccctgaa ccagtcacag tgagctggaa ctctggcgca	480
ctgacaagcg gagtccacac ttttccctgcc gtgctgcagt catccggcct gtactctctg	540
agctctgtgg tcaactgtccc cagttcaa at ttcgggaactc agacctatac atgcaacgtg	600
gaccataagc ctagcaatac caaggctgat aaaacagtg agcgtaaatg ctgcgtggaa	660
tgcccacctt gtccagcacc accagctgca gcccttccg tgttccctgtt tctccaaag	720
ccaaaagaca ccctgatgat ctctagaacc cccgaggtca catgcgtgggt cgtggacgtg	780
agtcacgagg atcctgaagt ccagtttaac tggtagctgg atggcgctga agtgcataat	840
gccaagacaa aaccaagaga ggaacagttc aactcaacct ttcgcgtcgt gtccgtgctg	900
acagtcgtgc accaggattg gctgaacggc aaggagtata agtgcaaatg gtccaataag	960
ggactgcccg ctccatctga gaaaactatt tccaagacca aaggacagcc tagggaacca	1020
caggtgtaca ctctgcccc ttcccgggag gaaatgacta agaaccagggt cagcctgacc	1080
tgtctggtga aagggttcta tccatgtgac attgccgtgg agtgggaatc aaatggtcag	1140
ccagagaaca attacaagac cacaccacc atgctggaca gtgatggctc attctttctg	1200
tatagcaagc tgaccgtcga taaatctagg tggcagcagg gaaacgtgtt ctccgtctcc	1260
gtgatgcacg aagcactgca caaccattac acccagaaat ccctgagcct gtcccccgcc	1320
tga	1323

5

<210> 60

<211> 1323

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 60

gaggtgcagc tggtcgagtc cgggggggggt ctggtgcagc caggaggatc cctgaggctg 60
agctgcgccg cttctgggtt cacattttcc agctacggca tgtcctgggt ccggcaggca 120
ccaggcaagg gactggagct ggtggccaca atcaacagta atgggggtag aacttactat 180
cccgactcag tgaagggcag gttcactatt agtcgggata actcaaaaaa taccctgtac 240
ctgcagatgg ggtccctgaa ggctgaagac atggcagtggt actattgtgc ccgcgatcag 300
ggtttcgctt attgggggca ggggtactctg gtcaccgtgt ctagtgcctc caccaaaggg 360
cccagcgtgt ttccactggc tccctgctcc cgaagcacat ctgagagtac tgcagccctg 420
ggctgtctgg tgaaggacta tttccctgaa ccagtcacag tgagctggaa ctctggcgct 480
ctgacatctg gagtccacac ttttccctgca gtgctgcagt catccggcct gtactccctg 540
agctctgtgg tccactgtccc cagttcaaatt ttccggaactc agacctatac atgcaacgtg 600
gaccataaac ctagcaatac caaggctgat aaaacagtggt agcgggaagtg ctgtgtggaa 660
tgccacacct gtccagctcc accagctgca gccccttctg tgttccctgtt tccctcaaag 720
ccaaaagaca ccctgatgat cagcaggacc cccgaggtca catgtgtggt cgtggacgtg 780
tctcacgagg atcctgaagt ccagtttaac tggtagctgg atggcgctcga agtgcataat 840
gcaaagacaa aaccaagaga ggaacagttc aactctacct ttccgctcgt gagtgtgctg 900
acagtgcgtg accaggattg gctgaacggc aaggagtata agtgcaaagt gtccaataag 960
ggactgcccg cccctatcga gaaaactatt agcaagacca aaggacagcc tcgagaacca 1020
caggtgtaca ctctgcccc tagtcgtgag gaaatgacta agaaccaggt ctccctgacc 1080
tgtctggtga aagggttcta tccctagcgac attgccgtgg agtgggaatc taatggtcag 1140
ccagagaaca attacaagac cacaccaccc atgctggaca gtgatggctc attctttctg 1200
tattcaaagc tgaccgtcga taaatccagg tggcagcagg gaaatgtgtt ttcattgctcc 1260
gtgatgcacg aagccctgca caaccattac accagaaga gcctgtccct gagccccggc 1320
tga 1323

<210> 61

<211> 1323

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 61

gaagtgcagc	tggtcgagtc	tggggggggg	ctggtgcagc	ctggcggatc	cctgagactg	60
agctgcgccg	cttctgggtt	cacatthttcc	agctacggca	tgtcctgggt	ccgccaggca	120
ccaggcaagg	gactggagct	ggtgagtaca	atcaactcaa	atgggggtcg	aacttactat	180
gctaactccg	tgaagggcag	gttcaactatt	tcccgggaca	acagcaaaaa	taccctgtac	240
ctgcagatgg	ggtccctgcg	agctgaagac	atggcagtgt	actattgtgc	ccgtgatcag	300
ggtttcgctt	attggggggca	gggtactctg	gtcaccgtgt	ctagtgcctc	taccaagggg	360
cccagtgtgt	ttccactggc	accctgctcc	cggagcacat	ctgagagtac	tgcagccctg	420
ggctgtcttg	tgaaggatta	tttccctgaa	ccagtcacag	tgagctggaa	ctctggcgca	480
ctgacaagcg	gagtccacac	ttttcctgcc	gtgctgcagt	catccggcct	gtactctctg	540
agctctgtgg	tcactgtccc	cagttcaaatt	ttcggaactc	agacctatac	atgcaacgtg	600
gaccataagc	ctagcaatac	caaggctgat	aaaacagtgg	agcgtaaatg	ctgtgtggaa	660
tgcccacctt	gtccagctcc	accagctgca	gcccccttctg	tgttcctgtt	tcctccaaag	720
ccaaaagaca	ccctgatgat	ctctagaacc	cccagggtca	catgtgtggt	cgtggacgtc	780
agtcacgagg	atccagaagt	ccagtttaac	tgttacgtgg	atggcgtcga	agtgcataat	840
gcaaagacaa	aaccagaga	ggaacagttc	aactcaacct	ttcgcgctgt	gtccgtgctg	900
acagtcgtgc	accaggactg	gctgaacggc	aaggagtata	agtgcaaagt	gtccaataag	960
ggactgcccg	cccctatcga	gaaaactatt	tccaagacca	aaggacagcc	tagggaacca	1020
cagggtgtaca	ctctgcccc	ttcccgggag	gaaatgacta	agaaccaggt	cagcctgacc	1080
tgtctggtga	aagggttcta	tcctagtgtg	attgccgtgg	agtgggaatc	aaatggtcag	1140
ccagagaaca	attacaagac	cacaccaccc	atgctggaca	gtgatggctc	attctttctg	1200
tatagcaagc	tgaccgtcga	taaatctagg	tggcagcagg	gaaatgtgtt	ttcatgctcc	1260
gtgatgcacg	aagccctgca	caaccactac	acacagaaaa	gcctgagcct	gagccccggc	1320
tga						1323

<210> 62

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 62

5

10

gaaatcgtga tgactcagtc ccccgctaca ctgagcgtgt ctcccggaga gagagctact 60
ctgtcttgca aggcaagtca ggacgtggga actgcagtcg cctggtacca gcagaaacca 120
ggacaggcac cacgactgct gatctattgg gctagtacaa ggcacactgg cattcctgcc 180
cggttcagtg gctcaggatc cgggacagag tttaccctga caatctccag cctgcagtcc 240
gaagatttcg ctgtgtacta ttgccagcag tactctagtt atccttggac ctttggtcag 300
ggcacaaaagg tcgagatcaa acgaaccgtg gccgctccaa gcgtcttcat ttttccccct 360
tctgacgaac agctgaagtc aggtacagcc tccgtggtct gtctgctgaa caatttctac 420
ccaagggagg caaagggtgca gtggaaagtc gataacgccc tgcagagcgg caattctcag 480
gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaggat tccacctata gcctgtcatc cactctgacc 540
ctgagcaaag ctgactacga aaagcataaa gtgtatgcat gtgaagtcac acaccagggc 600
ctgagttctc cagtcaccaa atcttttaat agaggcgagt gctga 645

<210> 63
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético
<400> 63

gaaatcgtga tgaccagtc tcctgctaca ctgagcgtgt ctcccggaga gagagctact 60
ctgtcttgca aggcaagtca ggacgtggga actgcagtcg cctggtacca gcagaaacca 120
ggacaggcac cacgactgct gatctattgg gctagtacaa ggcacactgg cattcctgcc 180
cggttcagtg gctcaggatc cgggacagag tttaccctga caatctccag cctgcagtcc 240
gaagatttcg ctgtgtactt ttgccagcag tactctagtt atccttggac cttcggtcag 300
ggcacaaaagg tcgagatcaa acgaaccgtg gccgctccaa gcgtcttcat ttttccccct 360
tctgacgaac agctgaagtc aggtacagcc tccgtggtct gtctgctgaa caatttttac 420
ccaagggagg caaagggtgca gtggaaagtc gataacgccc tgcagagcgg caattctcag 480
gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaggat tccacctata gcctgtcatc cactctgacc 540
ctgagcaaag ctgactacga aaagcataaa gtgtatgcat gtgaagtcac acaccagggc 600
ctgtccagtc cagtcaccaa atcctttaat cggggagagt gctga 645

<210> 64
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético
<400> 64

gatattcaga tgacccagtc tccttccagc ctgtctgcaa gtgtgggaga cagggtcacc 60
 atcacatgca aagcctccca ggatgtggga accgcagtcg cctggtacca gcagaagcca 120
 gggaaaagcc ccaagctgct gatctactgg gcttctacca ggcacacagg cgtgccaaagt 180
 cggttctcag gctccggaag cgggaccgac tttactctga ccatctccag cctgcagcct 240
 gaggatgtgg caacatactt ctgccagcag tactctagtt atccatggac ttttggtcag 300
 ggcaccaaag tcgagatcaa gagaactgtg gccgctccct ccgtcttcat ttttcccct 360
 agcgacgaac agctgaagag tggtagagcc tcagtgggtct gtctgctgaa caatttctac 420
 cctagggagg ctaaagtgca gtggaaggtc gataacgcac tgcagtctgg caatagtcag 480
 gagtcagtga cagaacagga ctccaaagat agcacttatt ctctgtcatc cacactgact 540
 ctgtctaagg ccgactacga aaagcataaa gtgtatgctt gtgaggtcac acaccaggg 600
 ctgagcagtc cagtcaccaa gagctttaac cgaggagagt gctga 645

<210> 65

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 65

gaaatcgtga tgacccagtc tcctgctaca ctgagcgtgt ctcccggaga gagagctact 60
 ctgtcttgca aggcaagtca ggacgtggga actgcagtcg cctggtacca gcagaaacca 120
 gggcagagtc cccgcctgct gatctattgg gcctccacaa ggcacactgg cattcctgct 180
 cggttcagtg gctcaggatc cgggacagag tttaccctga caatctccag cctgcagagc 240
 gaagatttcg ccgtgtactt ttgccagcag tactctagtt atccttggac cttcggtcag 300
 ggcacaaagg tcgagatcaa acgaaccgtg gccgctccaa gcgtcttcat ttttcccct 360
 tctgacgaac agctgaagtc aggtacagct tccgtgggtct gtctgctgaa caatttttac 420
 ccaagggagg caaagggtgca gtggaagtc gataacgccc tgcagagcgg caattctcag 480
 gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaggat tccacctata gcctgtcatc cactctgacc 540

ctgtctaagg ctgactacga aaagcataaa gtgtatgcat gtgaagtcac ccaccagggg 600
 ctgagtagtc cagtcaccaa gagttttaat cggggcgagt gttga 645

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este, donde dicho anticuerpo o un fragmento de unión a Notch4 de este comprende cadenas pesadas y ligeras y se selecciona entre cualquiera de los siguientes (i) - (vii):
- (i) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45,
- (ii) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45,
- (iii) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47,
- (iv) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 49,
- (v) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 51,
- (vi) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 39 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45, y
- (vii) un anticuerpo en el que la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.
2. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.
3. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.
4. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.
5. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 49.
6. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 33 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 51.
7. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 39 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 45.
8. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 y la región variable de dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.
9. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la región constante de dicha cadena pesada y la región constante de dicha cadena ligera comprenden la región constante de un anticuerpo humano.
10. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 9, donde la región constante de dicha cadena pesada comprende la región constante de IgG humana.
11. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha región constante de IgG humana es la región constante de IgG2 humana.
12. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicha región constante de IgG2 humana tiene una mutación V234A y/o G237A.

- 5
13. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde el residuo de lisina en el extremo carboxi de la región constante de dicha cadena pesada se elimina de forma artificial.
14. El anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde la región constante de dicha cadena ligera comprende la región constante de IgK humana.
- 10
15. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Notch4 o un fragmento de unión a Notch4 de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de tiroides, cáncer de próstata o carcinoma hepatocelular.

Figura 1

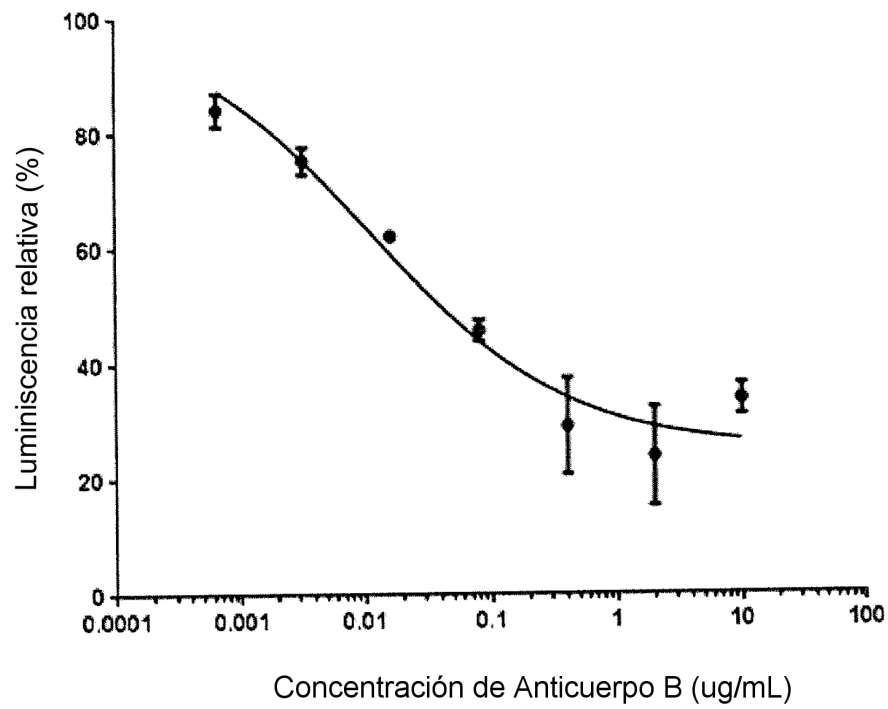


Figura 2

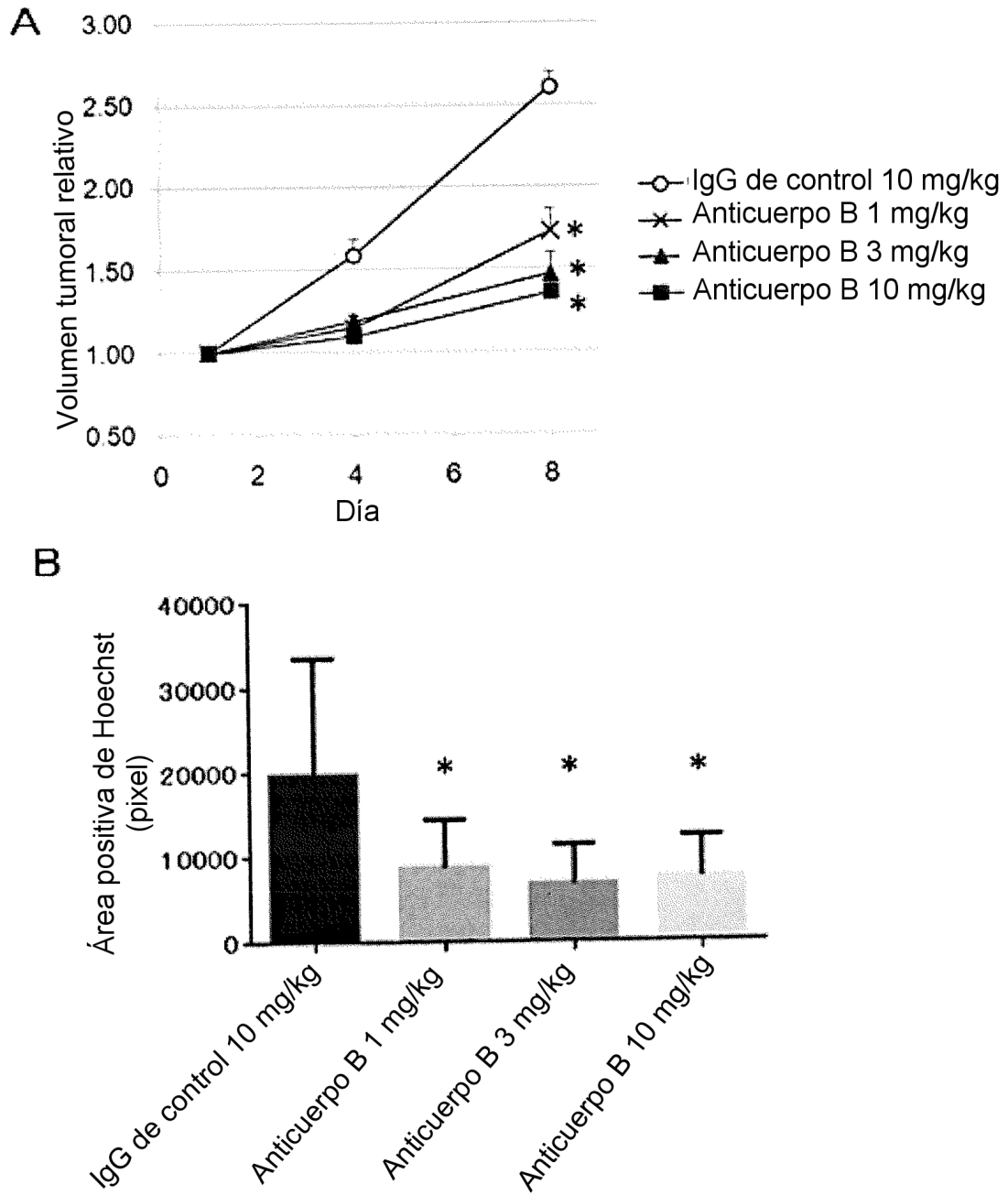


Figura 3

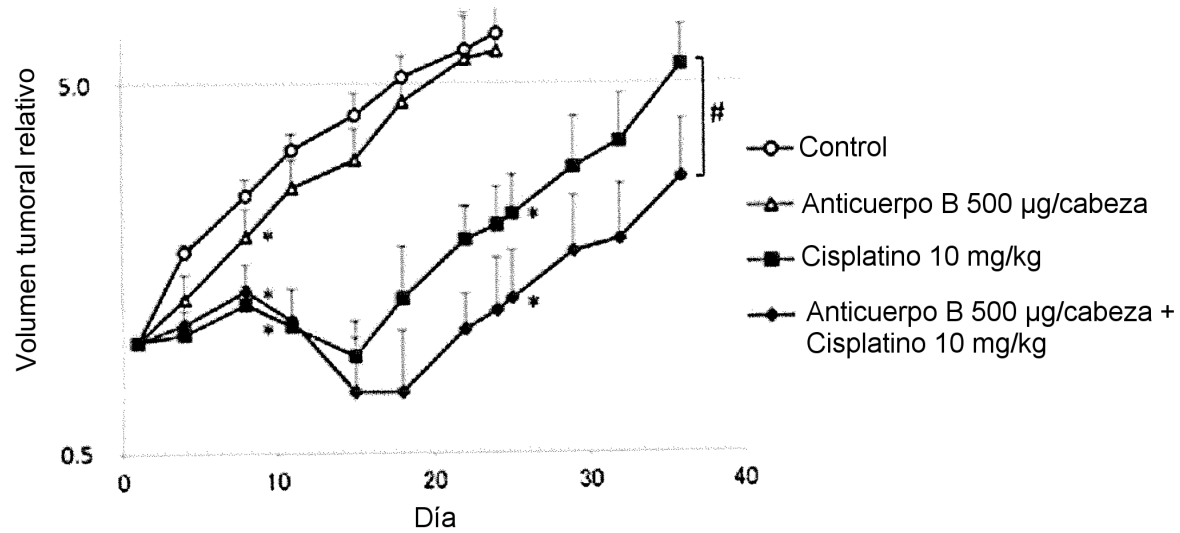


Figura 4

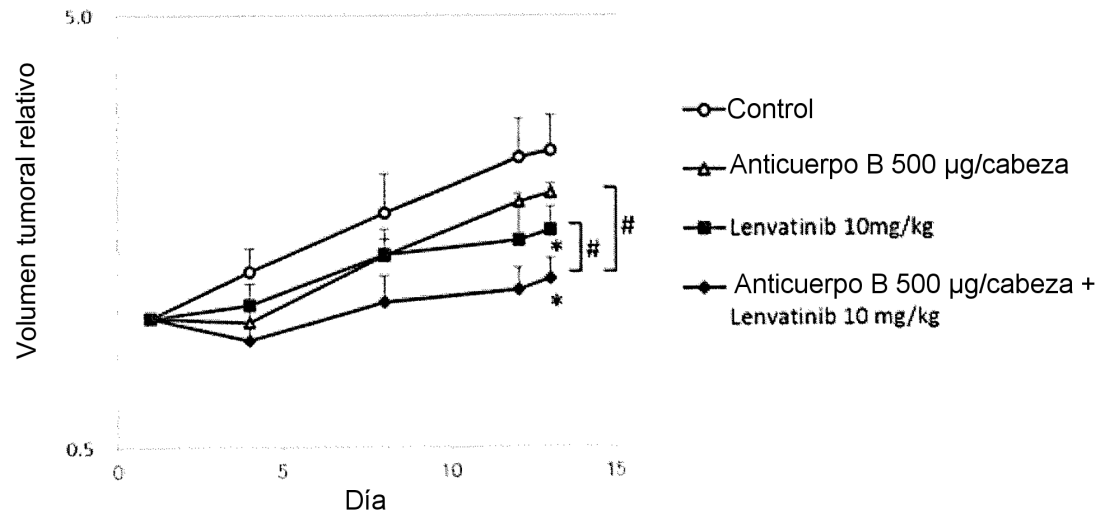


Figura 5

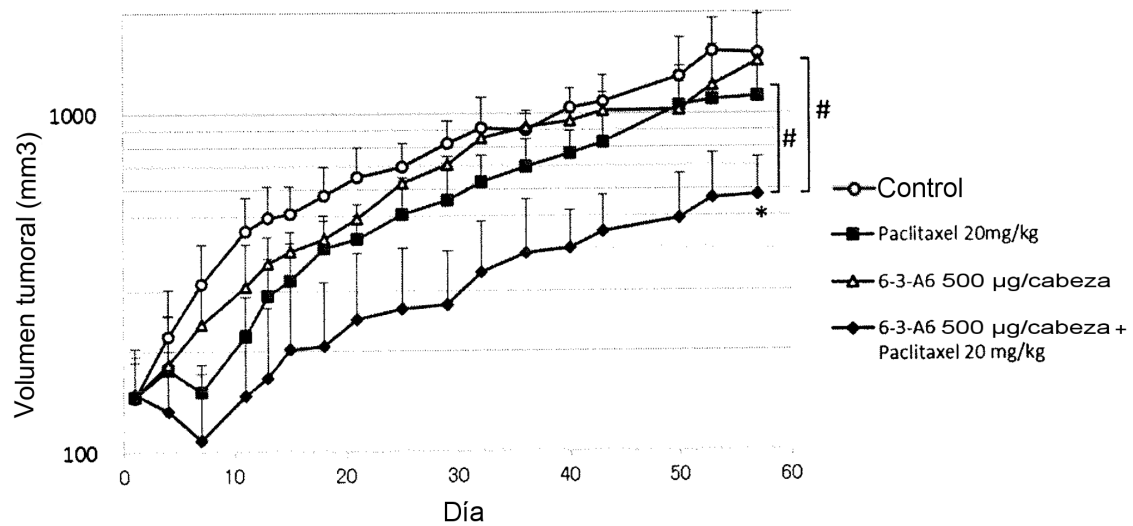


Figura 6

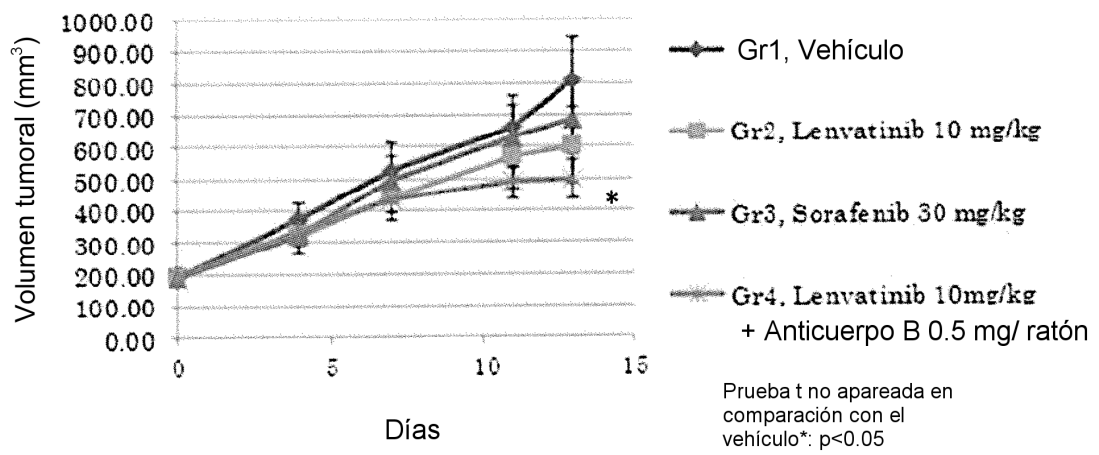


Figura 7

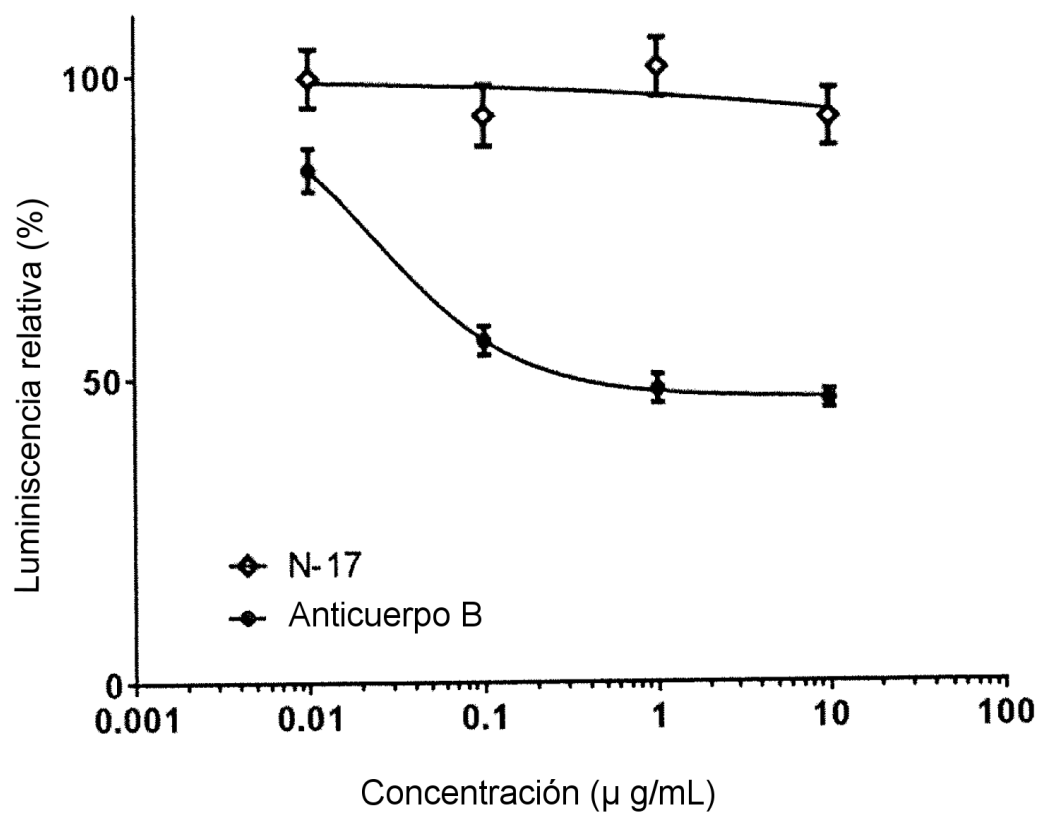


Figura 8

