



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0719409-9 A2



(22) Data de Depósito: 17/12/2007
(43) Data da Publicação: 11/02/2014
(RPI 2249)

(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/28
C12N 15/13
C12N 5/12
A61K 39/395
A61P 35/00

(54) Título: "REGIÕES VARIÁVEIS DA CADEIA PESADA ("VH"), SEQUÊNCIAS DA CADEIA VH, ÁCIDO NUCLEÍCO, VETOR, CÉLULA, ANTICORPOS, USO DO ANTICORPO, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO, ANTICORPO ANTI-NOTCH3 E FORMA HUMANIZADA DO ANTICORPO"

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 18/12/2006 US 60/875,597, 06/01/2007 US 60/879,218, 06/01/2007 US 60/879,218, 18/12/2006 US 60/875,597

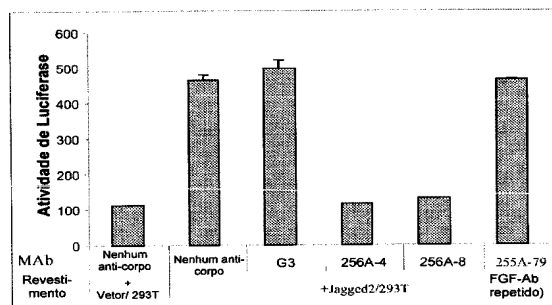
(73) Titular(es): GENENTCH, INC.

(72) Inventor(es): BIN-BING STEPHEN ZHOU, KANG LI, SANJAYA SINGH, Sek Chung Fung, YUCHENG LI

(74) Procurador(es): Paola Calabria Mattioli

(86) Pedido Internacional: PCT US2007087723 de 17/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/076960 de 26/06/2008



5

10

15

15

20

25

Os mamíferos possuem quatro proteínas receptoras Notch (designadas Notch1 a Notch4) e cinco ligantes correspondentes (designados Delta-1 (DLL-1), Delta-3 (DLL-3), Delta-4 (DLL-4), Jagged-1 e Jagged-2). Os genes do receptor Notch de mamíferos codificam proteínas com
5 aproximadamente 300 kD que são clivadas durante seu transporte para a superfície celular e existem como heterodímeros. A porção extracelular do receptor Notch tem trinta e quatro repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e três repetições Notch/LIN12 ricas em cisteína. A associação de duas subunidades clivadas é mediada pelas sequências que
10 se encontram imediatamente no N-terminal e C-terminal do sítio de clivagem, e estas duas subunidades constituem os domínios de heterodimerização (HD) (Wharton, *et al.*, *Cell* 43:567 (1985); Kidd, *et al.*, *Mol Cell Biol* 6:3431 (1986); Kopczynski, *et al.*, *Genes Dev* 2:1723 (1988); Yochem, *et al.*, *Nature* 335:547 (1988)).

Até o momento ainda não está claro como a sinalização Notch é regulada por diferentes receptores e como os cinco ligantes diferem em sua sinalização ou regulação. As diferenças na sinalização e/ou regulação podem ser controladas por seus padrões de expressão nos diferentes tecidos e por diferentes pistas ambientais. Foi documentado que as proteínas ligantes
15 Notch, incluindo Jagged/Serrate e similares a Delta/Delta, se ligam especificamente à região de repetição do EGF e induzem a sinalização Notch mediada por receptor (revisado por Bray, *Nature Rev Mol Cell Biol.* 7:678 (2006), e por Kadesch, *Exp Cell Res.* 260:1 (2000)). Entre as repetições do EGF, a 10^a e a 12^a repetição são necessárias para ligação do ligante ao
20 receptor, e as outras repetições do EGF podem aumentar a interação receptor-ligante (Xu, *et al.*, *J Biol Chem.* 280:30158 (2005); Shimizu, *et al.*, *Biochem Biophys Res Comm.* 276:385 (2000)). Embora as repetições LIN12 e o domínio de dimerização não estejam diretamente envolvidos na ligação do

ligante, eles desempenham um papel importante na manutenção do complexo de proteínas heterodiméricas, evitando a clivagem da protease independente do ligante e ativação do receptor (Sanche-Irizarry, *et al.*, *Mol Cell Biol.* 24:9265 (2004); Vardar *et al.*, *Biochem.* 42:7061 (2003)).

5 A expressão de formas mutantes dos receptores Notch no desenvolvimento de embriões interfere profundamente no desenvolvimento normal (Coffman, *et al.*, *Cell* 73: 659 (1993)). Descobriu-se que um Notch1 nocaute é letal na fase embrionária em camundongos (Swiatek, *et al.*, *Genes & Dev* 8:707 (1994)). Em humanos, tem havido diversas doenças genéticas, incluindo câncer, diferentes mutações no receptor Notch (Artavanis-Tsakonas, *et al.*, *Science* 284:770 (1999)). Por exemplo, a ativação anormal do receptor Notch1 causada pela translocação pode levar à leucemia linfoblástica de células T (Ellisen, *et al.*, *Cell* 66:649 (1991)). Certas mutações nos domínios HD do receptor Notch1 aumentam a sinalização sem a ligação do ligante 15 (Malecki, *et al.*, *Mol Cell Biol* 26:4642 (2006)), ainda, complicando sua função na ativação do receptor Notch. O sinal induzido pela ligação do ligante é transmitido ao núcleo por um processo que envolve duas clivagens proteolíticas do receptor seguido por translocação nuclear do domínio intracelular (Notch-IC). Embora sabendo que as repetições LIN12 e os 20 domínios HD evitem a sinalização na ausência de ligantes, ainda não é claro como o ligante facilita os eventos de clivagem proteolítica.

Os receptores Notch têm sido relacionados com diversas doenças incluindo câncer, disfunções neurológicas e doenças imunes, conforme evidenciado por relatos da superexpressão de receptores Notch em vários tecidos doentes humanos e linhagens celulares, em comparação às células 25 normais ou não-malignas (Joutel, *et al.* *Cell & Dev Biol* 9:619 (1998); Nam, *et al.*, *Curr Opin Chem Biol* 6:501 (2002)). O receptor Notch3 é superexpresso em vários tumores sólidos, incluindo câncer de células não-pequenas (NSCLC) e

câncer ovariano (Haruki, *et al.*, *Cancer Res* 65:3555 (2005); Park, *et al.*, *Cancer Res* 66:6312 (2006); Lu, *et al.*, *Clin Cancer Res* 10:3291 (2004)), sugerindo a significância da expressão do receptor Notch3 em tumores sólidos. Além disso, a expressão do receptor Notch3 é suprarregulada em neoplasmas de plasmócitos, incluindo mieloma múltiplo, leucemia de plasmócitos e plasmocitoma extramedular (Hedvat, *et al.*, *Br J Haematol* 122:728 (2003); câncer pancreático (Buchler, *et al.*, *Ann Surg* 242:791 (2005)); e leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) (Bellavia, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3788 (2002); Screpanti, *et al.*, *Trends Mol Med* 9:30 (2003)). O receptor Notch3 também é expresso em um subconjunto de linhagens de neuroblastoma como um marcador para este tipo de tumor que tem mutações constitucionais ou específicas de tumor no gene homeobox Phox2B (van Limpt, *et al.*, *Cancer Lett* 228:59 (2005)). Outras indicações e doenças que têm sido relacionadas à expressão do receptor Notch3 incluem disfunções neurológicas (Joutel, *et al.*, *Nature* 383:707 (1996)), diabetes (Anastasi, *et al.*, *J Immunol* 171:4504 (2003), artrite reumatóide (Yabe, *et al.*, *J Orthop Sci* 10:589 (2005)), doenças vasculares (Sweeney, *et al.*, *FASEB J* 18:1421 (2004)), e síndrome de Alagille (Flynn, *et al.*, *J Pathol* 204:55 (2004)).

Embora a superexpressão do receptor Notch3 tenha sido observada em vários cânceres (incluindo amplificação gênica), nenhuma mutação de ativação foi ainda relatada. É plausível que um nível aumentado de receptores Notch3 em tumores possa ser ativado por diferentes ligantes em células estromais ou células tumorais e que isto leve a um aumento na sinalização Notch3. Particularmente, ligantes Notch foram localizados no endotélio vascular durante o desenvolvimento e tumorigênese (Mailhos, *et al.*, *Differentiation* 69:135 (2001); Taichman, *et al.*, *Dev Dyn* 225: 166 (2002)), sugerindo que células endoteliais poderiam fornecer os ligantes para a ativação do receptor Notch3 nos tumores. Uma linha cruzada similar tumor-estroma

mediada pelo ligante e receptor Notch foi demonstrada em diferentes tipos de cânceres (Houde, *et al.*, *Blood* 104: 3697 (2004); Jundt, *et al.*, *Blood* 103: 3511 (2004); Zeng, *et al.*, *Cancer Cell* 8: 13 (2005)). A sinalização aumentada de Notch3 causada pela superexpressão de Notch3 intracelular (Notch3-IC) pode
 5 levar à tumorigênese T-ALL e câncer de mama em modelos animais (Vacca, *et al.*, *The EMBO J* 25: 1000 (2006); Hu, *et al.*, *Am J Pathol* 168: 973 (2006)).

A sinalização Notch e seu papel na autorenovação celular têm sido relacionados a células-tronco cancerosas, que são tumores na minoria da população e podem dar início à formação de tumor (Reya, *et al.*, *Nature*
 10 414:105 (2001)). As células-tronco normais de muitos tecidos, incluindo células-tronco intestinais e neuronais, dependem da sinalização Notch para autorenovação e determinação de morte celular (Fre, *et al.*, *Nature*, 435: 964 (2005); van Es, *et al.*, *Nature*, 435:959 (2005); Androutsellis-Theotokis, *et al.*, *Nature*, 442: 823 (2006)). Mecanismos similares podem existir em células
 15 tronco cancerosas e a inibição da sinalização Notch pelos inibidores γ -secretase mostrou depletar células-tronco cancerosas e bloquear o enxerto em tumores cerebrais embrionários (Fan, *et al.*, *Cancer Res* 66:7445 (2006)).

A inibição da sinalização Notch pelo inibidor γ -secretase tem efeitos antineoplásicos impressionantes nas células transformadas pela
 20 expressão de Notch *in vitro* e em modelos de xenoenxerto (Weijzen, *et al.*, *Nat Medicine* 8: 879 (2002); Bocchetta, *et al.*, *Oncogene* 22:81 (2003); Weng, *et al.*, *Science*, 306:269 (2004)). Mais recentemente, um inibidor γ -secretase mostrou destruir de maneira eficaz adenoma de cólon em camundongos Apc (min+)
 25 (van Es, *et al.*, *Nature*, 435: 959 (2005)), embora a janela terapêutica, devido ao seu efeito em células-tronco normais e a inibição de vias Notch múltiplas, seja muito estreita. Diferente de Notch1, um gene Notch3 nocaute em camundongos foi letal na fase embrionária e apresentou muitos defeitos (Domenga, *et al.*, *Genes & Dev* 18: 2730 (2004)), sugerindo que Notch 3

fornece um alvo terapêutico potencialmente melhor que Notch1.

Tournier-Lasserre *et al.* (pedido U.S. 2003/0186290) ensina a associação do receptor Notch3 e CADASIL. O pedido divulga várias mutações no gene Notch3 e a possível associação com a doença CADASIL. O pedido sugere o uso de anticorpos de diagnóstico para detectar tais mutações. O pedido também sugere anticorpos terapêuticos para tratar CADASIL, isto é, anticorpos agonísticos, mas nenhum anticorpo específico é divulgado nem como produzir tais anticorpos.

Em vista do amplo número de doenças humanas associadas com a via de sinalização Notch3, é importante que novas maneiras de prevenir e tratar estas doenças sejam identificadas. A invenção atual fornece novos anticorpos anti-Notch3 úteis para esta necessidade médica não atendida.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece novos anticorpos e fragmentos destes que se ligam especificamente a um epitopo conformacional do receptor Notch3 humano, cujo epitopo compreende o domínio LIN12 e o domínio de heterodimerização. Outro aspecto da invenção inclui o sítio de ligação do epitopo e anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo que os anticorpos da presente invenção. Os anticorpos da presente invenção inibem a sinalização induzida por ligante através do receptor Notch3.

A invenção inclui as sequências de aminoácidos das cadeias variáveis pesada e leve dos anticorpos e suas sequências de ácido nucléico correspondentes. Outra realização da invenção inclui as sequências CDR destes anticorpos. Outra realização inclui formas humanizadas destes anticorpos.

Outra realização da presente invenção inclui linhagens celulares e vetores que ancoram as sequências do anticorpo da presente invenção.

A presente invenção também inclui o epitopo conformacional

reconhecido pelos anticorpos antagonistas da invenção. A presente invenção também inclui anticorpos que se ligam a este epitopo conformacional. As realizações incluem um epitopo conformacional Notch 3 que compreende o domínio LIN12 que tem pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade de sequência com a SEQ ID NO. 9 e o domínio 2 de dimerização que tem pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade de sequência com a SEQ ID NO. 18. Mais especificamente, o epitopo conformacional Notch 3 compreende os resíduos de aminoácidos 1395-1396, 1402-1404 e 1420-1422 do domínio L1 LIN12 e os resíduos de aminoácidos 1576-1578 e 1626-1628 do domínio de dimerização D2. A presente invenção inclui anticorpos que se ligam a este epitopo conformacional.

Outra realização da presente invenção é o uso de qualquer um destes anticorpos para a preparação de um medicamento ou composição para o tratamento de doenças e disfunções associadas à ativação do receptor Notch3.

Outra realização da presente invenção é o uso de qualquer um destes anticorpos no tratamento de disfunções associadas com a ativação de Notch3, que compreende a inibição da dita ativação, por exemplo, pela inibição da sinalização Notch3 ou neutralização do receptor pelo bloqueio da ligação do ligante. Doenças relacionadas ao Notch3 podem incluir, mas não se limitam a, leucemia linfoblástica aguda, linfoma, doença envolvendo vascularização anormal, diabetes, câncer ovariano, doenças envolvendo morte celular vascular, artrite reumatóide, câncer pancreático, câncer de pulmão de células não-pequenas, neoplasmas de plasmócitos (como mieloma múltiplo, leucemia de plasmócitos e plasmocitoma extramedular) e neuroblastoma.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 descreve a sequência de aminoácidos de Notch3. A região de repetição do EGF se estende do resíduo de aminoácido 43 até 1383;

o domínio LIN12 se estende do resíduo de aminoácido 1384 até 1503; e o domínio de dimerização se estende do resíduo de aminoácido 1504 até 1640.

A figure 2 (A-H) mostra a comparação da sequência de aminoácido entre Notch 1, Notch 2, Notch 3 e Notch 4.

5 A figura 3 mostra a porcentagem de identidade de Notch 1, Notch 2, Notch 3 e Notch 4.

As figuras 4A e 4B mostram as sequências das regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo monoclonal anti-Notch3 MAb 256A-4 (SEQ ID NO: 2), com as regiões CDR sublinhadas.

10 As figuras 5A e 5B mostram as sequências das regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo monoclonal anti-Notch3 MAb 256A-8 (SEQ ID NO: 4), com as regiões CDR sublinhadas.

15 A figura 6 mostra um teste de luciferase repórter do Exemplo 5 mostrando os efeitos inibitórios dos anti-Notch3 MAbs sobre o ligante Notch3 Jagged 1.

A figura 7 mostra o teste de luciferase repórter mostrando os efeitos inibitórios dos anti-Notch3 MAbs sobre o ligante Notch3 Jagged 2.

A figura 8 mostra o teste de luciferase repórter mostrando os efeitos inibitórios dos anti-Notch3 MAbs sobre o ligante Notch3 DLL4.

20 A figura 9 mostra o teste de luciferase repórter mostrando os efeitos inibitórios para os Notch3 nativos em células cancerosas ovarianas pelos anti-Notch3 MAbs. (9A) linhagem celular de câncer ovariano humano, OV/CAR3 e (9B) linhagem celular de câncer ovariano humano, A2780.

25 A figure 10 mostra o teste de apoptose do Exemplo 6 mostrando que o efeito da sobrevivência celular induzido por Jagged1 foi inibido pelos anti-Notch3 MAbs.

A figura 11 mostra o efeito inibitório de anti-Notch3 MAbs na migração celular (11A) e invasão (11B) do Exemplo 7.

A figura 12 mostra um diagrama esquemático da proteína de troca de domínio Notch1-Notch3 expressa como uma proteína de fusão com IgG/Fc humana ligado ao C-terminal.

A figura 13A mostra um ELISA que usa o anticorpo controle Fc anti-humano enquanto a detecção do anticorpo mostra que as proteínas da figura 12 foram expressas no meio condicionado. A figura 13B mostra um ELISA usando-se 256A-4 como anticorpo de detecção. A figura 13C mostra um ELISA usando-se 256A-8 como anticorpo de detecção. A figura 13D mostra um ELISA usando-se o anticorpo controle positivo 256A-13 como anticorpo de detecção.

A figura 14 mostra a comparação da sequência codificadora do peptídeo líder Notch3 modificado geneticamente em relação à sequência codificadora do peptídeo líder Notch3 nativo (NCBI GenBank número de acesso NM_000435) mostrando as trocas de nucleotídeos (14A) e a sequência de aminoácido traduzida da sequência do peptídeo líder Notch3 modificado geneticamente (14B).

A figura 15 descreve a geração do constructo com troca de domínio pelo método PCR-SOE. As flechas representam os *primers* de PCR. As barras vazias, a sequência de Notch3. As barras preenchidas, a sequência de Notch1.

A figura 16 mostra as sequências de aminoácidos usadas no mapeamento do epítipo do domínio LIN12 de Notch3 LIN12 de MAb 256A-4 e 256A-8.

Nestes experimentos ELISA, a ligação de Mab 256A-4 e 256A-8 a Notch-3-LD/Fc (L1) foi usada como padrão positivo, ou seja, 100% de ligação. A leitura de ligação a proteínas trocadas recombinantes foi comparada ao padrão positivo. +++: mais de 50% da ligação padrão. ++: 10 a 40% de ligação padrão; +: 10% ao sinal positivo mínimo. -: sem ligação, ou seja, leitura média

de ligação MabG3 +/- 3X erro padrão. Mab G3 é um IgG1 humano controle de Mab usado como controle negativo.

A figura 17 mostra as sequências de aminoácidos usadas no mapeamento do epitopo do domínio de dimerização de Notch3 de MAb 256A-4 e 256A-8.

Nestes experimentos ELISA, a ligação de Mab 256A-4 e 256A-8 a Notch-3-LD/Fc (D2) foi usada como padrão positivo, ou seja, 100% de ligação. A leitura de ligação a proteínas trocadas recombinantes foi comparada ao padrão positivo. +++: mais de 50% da ligação padrão. ++: 10 a 40% de ligação padrão; +: 10% ao sinal positivo mínimo. -: sem ligação, ou seja, leitura média de ligação MabG3 +/- 3X erro padrão. Mab G3 é um IgG1 humano controle de Mab usado como controle negativo.

A figura 18 mostra um esquema do sítio de ligação do epitopo para MAb 256A-4 e 256A-8.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Esta invenção não está limitada a metodologias, protocolos, linhagens celulares, vetores ou reagentes específicos descritos no presente pedido, pois estes podem variar. Ainda, a terminologia usada no presente pedido é para os propósitos de descrição das realizações específicas e não se destina a limitar o escopo da presente invenção. Como usado no presente pedido e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma” e “o/a” incluem os respectivos plurais, a menos que o contexto dite claramente de outra forma, por exemplo, a referência a “uma célula hospedeira” inclui uma pluralidade de tais células hospedeiras. A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos e qualquer acrônimo usados no presente pedido têm o mesmo significado daquele comumente entendido por um do técnico no assunto no campo da invenção. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente pedido

possam ser usado na prática da presente invenção, os métodos exemplares, dispositivos e materiais são descritos no presente pedido.

Todas as patentes e publicações mencionadas no presente pedido são incorporadas no presente pedido como referência até a extensão permitida pela lei para os propósitos de descrição e divulgação das proteínas, enzimas, vetores, células hospedeiras e metodologias relatadas neste que poderiam ser usadas na presente invenção. No entanto, nada no presente pedido deve ser considerado como uma admissão de que a invenção não seja designada a preceder tal divulgação em virtude de invenção anterior.

DEFINIÇÕES

Os termos usados ao longo deste pedido devem ser considerados como tendo significado comum e típico para os técnicos no assunto. No entanto, a Requerente deseja que os termos a seguir tenham as definições específicas abaixo.

A frase "substancialmente idêntica" em relação a uma sequência de polipeptídeo de uma cadeia do anticorpo pode ser considerada como uma cadeia do anticorpo que exibe pelo menos 70%, 80%, 90% ou 95% de identidade de sequência em relação à sequência polipeptídica de referência. O termo em relação a uma sequência de de ácido nucléico pode ser considerado como uma sequência de nucleotídeos que exibe pelo menos 85%, 90%, 95% ou 97% de identidade de sequência em relação à sequência de ácido nucléico.

O termo "identidade" ou "homologia" significa a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de uma sequência correspondente àquela sendo comparada, após o alinhamento das sequências e introdução de *gaps*, se necessário, para alcançar a porcentagem máxima de identidade de sequência, sem considerar qualquer substituição conservativa como parte da identidade de sequência. Tanto as extensões N-terminal e C-terminal como também as inserções não

serão consideradas como redução de identidade ou homologia. Métodos e programas de computador para o alinhamento são bem conhecidos na técnica. A identidade de sequência pode ser medida usando-se um programa de análise de sequência.

O termo "anticorpo" é usado em sentido mais amplo e especificamente abrange anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais inteiros), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) e fragmentos de anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada. Anticorpos (Abs) e imunoglobulinas (Igs) são glicoproteínas que têm as mesmas características estruturais. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação para um antígeno específico, as imunoglobulinas incluem tanto anticorpos como outras moléculas similares a anticorpos, que geralmente são desprovidas de especificidade de alvo. Os anticorpos da invenção podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IGA e IgY), classe (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) ou subclasse. Anticorpos nativos e imunoglobulinas são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas com cerca de 150.000 daltons, compostas de duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H). Cada cadeia pesada tem em uma terminação, um domínio variável (VH) seguido por vários domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma terminação (VL) e um domínio constante em sua outra terminação.

Como usado no presente pedido, "anticorpo anti-Notch3" significa um anticorpo que se liga especificamente ao um Notch3 humano de modo a inibir ou substancialmente reduzir a ligação de Notch3 a seu ligante ou inibir a sinalização Notch3.

O termo "variável" no contexto de domínio variável de anticorpos, refere-se ao fato de que certas porções do domínio variável diferenciam-se

extensivamente na sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico ao seu alvo específico. No entanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente por todos os domínios variáveis dos anticorpos. Ela está concentrada em três segmentos chamados regiões determinadas por complementaridade (CDRs, isto é CDR1, CDR2 e CDR3) como também regiões hipervariáveis, ambas nos domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas de regiões de estrutura (FR). Os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas nativas compreendem cada um, quatro regiões FR adotando amplamente uma configuração folha dobrada β , conectada por três CDRs, na qual formam alças que se conectam, e em alguns casos formam parte da estrutura folha dobrada β . As CDRs em cada cadeia são mantidas bem juntas pelas regiões FR e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação do alvo dos anticorpos. (consulte, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1987)). Como usado no presente pedido, a numeração de resíduos de aminoácidos de imunoglobulina é feita de acordo com o sistema de numeração de resíduos de aminoácidos de imunoglobulina de Kabat, a menos que indicado de outra forma.

O termo "fragmento de anticorpo" refere-se a uma porção de um anticorpo inteiro, geralmente a ligação alvo ou região variável. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos F(ab), F(ab'), F(ab')₂ e Fv. A frase "fragmento funcional ou análogo" de um anticorpo é um composto que tem uma atividade biológica qualitativa em comum com um anticorpo inteiro. Por exemplo, um fragmento funcional ou análogo de um anticorpo anti-Notch3 é aquele que se liga a um receptor Notch3 de modo a prevenir ou substancialmente reduzir a capacidade do receptor se ligar ao seu ligante ou iniciar a sinalização. Como usado no presente pedido, "fragmento funcional"

com relação a anticorpos refere-se aos fragmentos Fv, F(ab) e F(ab')₂. Um fragmento "Fv" consiste em um dímero de uma cadeia pesada e um domínio variável da cadeia leve em estreita associação não covalente (dímero V_H-V_L). É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação alvo na superfície do dímero V_H-V_L. Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação alvo ao anticorpo. No entanto, até um único domínio variável (ou metade de um Fv que compreende somente três CDRs específicas para um alvo) possui a capacidade de reconhecer e se ligar a um alvo, embora com afinidade mais baixa do que aquela do sítio de ligação completo.

Fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "sFv" compreendem os domínios V_H e V_L de um anticorpo, sendo que estes domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídica. Geralmente, o polipeptídeo Fv também compreende um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L, que permite ao scFv formar a estrutura desejada para a ligação alvo.

O termo "diacorpos" refere-se a fragmentos de anticorpos pequenos com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável da cadeia leve (V_L) na mesma cadeia polipeptídica. Pelo uso de um ligante que é muito curto para permitir pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno.

O fragmento F(ab) contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos F(ab') diferem de fragmentos F(ab) pela adição de poucos resíduos na terminação carboxila de um domínio CH1 de cadeia pesada, incluindo uma ou mais

cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. Fragmentos F(ab') são produzidos pela clivagem da ligação bissulfeto nas dobradiças de cisteína do produto da digestão de pepsina F(ab')₂. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos são conhecidos pelos técnicos no assunto.

O termo "anticorpo monoclonal", como usado no presente pedido, refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto pela possível ocorrência natural de mutações que podem estar presentes em menores quantidades. Os anticorpos monoclonais no presente pedido especificamente incluem anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas), nos quais uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica a, ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo específica, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico a, ou homólogo às sequências correspondentes nos anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (patente US 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio alvo. Além disso, ao contrário preparações de anticorpo convencional (policlonal) que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no alvo. Em adição às suas especificidades, os anticorpos monoclonais são vantajosos, pois eles podem ser sintetizados por cultura de hibridoma, não contaminada por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não sendo

construído como produção requerida do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais para uso na presente invenção podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago, usando-se técnicas conhecidas. Por exemplo, os anticorpos monoclonais para serem
5 usados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método de hibridoma, primeiro descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante.

Formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (por exemplo, murino) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou
10 fragmentos destes (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências que se ligam ao alvo) que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todos das regiões CDR
15 correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas das regiões FR são aquelas de uma sequência molde de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) da imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana molde
20 escolhida.

Os termos “célula”, “linhagem celular” e “cultura celular” incluem progênie. Entende-se também que toda a progênie pode não ser precisamente idêntica em conteúdo de DNA, devido a mutações premeditadas ou acidentais. Progênies variantes que têm a mesma função ou propriedade biológica,
25 conforme selecionadas para a célula originalmente transformada são também incluídas. As “células hospedeiras” usadas na presente invenção geralmente são de hospedeiros procariontes ou eucariontes.

“Transformação” de um organismo celular, célula ou linhagem

celular com DNA significa introdução de DNA em uma célula alvo, de forma que o DNA seja replicável, tanto como um elemento extracromossomal como por integrante cromossomal. "Transfecção" de uma célula ou organismo com DNA refere-se à tomada do DNA, por exemplo, de um vetor de expressão, por uma célula hospedeira, se quaisquer sequências codificadoras são ou não expressas de fato. Os termos "célula hospedeira transfectada" e "transformada" refere-se a uma célula na qual o DNA foi introduzido. A célula é denominada "célula hospedeira" e pode ser tanto procarionte como eucarionte. Células hospedeiras procariontes típicas incluem várias linhagens de *E.coli*. Células hospedeiras eucariontes típicas são célula de mamíferos, como célula ovariana de hamster chinês ou células de origem humana. A sequência de DNA introduzida pode ser da mesma espécie da célula hospedeira ou de diferentes espécies daquela da célula hospedeira, ou pode ser uma sequência de DNA híbrida, contendo DNA estranho e homólogo.

O termo "vetor" significa uma construção de DNA contendo uma sequência de DNA ligada de forma funcional a uma sequência controle capaz de efetuar a expressão da sequência de DNA em um hospedeiro adequado. Tais sequências controle incluem um promotor para efetuar a transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar tal transcrição, uma sequência que codifica sítios de ligação de mRNA ribossomal, e sequências que controlam a terminação da transcrição e tradução. O vetor pode ser um plasmídeo, uma partícula de fago ou simplesmente um inserto genômico potencial. Uma vez transformado na célula hospedeira, o vetor pode se replicar e funcionar independentemente do genoma hospedeiro ou pode, em alguns casos, se integrar no próprio genoma. No presente relatório descritivo, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados algumas vezes alternadamente, enquanto que o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente utilizada. No entanto, a invenção destina-se a incluir outras formas de vetor que têm função

equivalente daquelas existentes e conhecidas na técnica.

“Mamífero” para os propósitos do tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de criação, primatas não humanos, de zoológico, para esportes, ou animais de estimação, como cachorros, cavalos, gatos, vacas, etc.

A palavra “marcador”, quando usada no presente pedido, refere-se a um composto ou composição detectável que pode ser conjugada diretamente ou indiretamente a uma molécula ou proteína, por exemplo, um anticorpo. O marcador pode ser detectável por si mesmo (por exemplo, marcadores de radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, este pode catalisar alteração química de um composto ou composição do substrato que é detectável.

Como usado no presente pedido, “fase sólida” significa uma matriz não aquosa à qual o anticorpo da presente invenção pode ser aderido. Exemplos de fases sólidas englobadas no presente pedido incluem aquelas formadas parcialmente ou inteiramente de vidro (por exemplo, vidro poroso controlado), polissacarídeos (por exemplo, agarose), poliacrilamidas, poliestireno, poliestireno, álcool polivinílico e silicones. Em certas realizações, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender a cavidade de uma placa de teste, em outras é uma coluna de purificação (por exemplo, uma coluna de cromatografia de afinidade).

Como usado no presente pedido, o termo “disfunção mediada por Notch-3” significa uma condição ou doença que é caracterizada pela superexpressão e/ou hipersensibilidade do receptor Notch-3. Especificamente, deve-se considerar as condições associadas ao câncer, como um câncer de pulmão de célula não-pequena, câncer ovariano e leucemia linfoblástica aguda de células T. Outros cânceres incluindo pancreático, de próstata, neoplasmas de plasmócitos (por exemplo, mieloma múltiplo, leucemia de plasmócitos e

plasmocitoma extramedular), neuroblastoma e plasmocitoma extramedular também são englobados no escopo deste termo. Outros tipos de doenças incluem linfoma, síndrome de Alagille, vascularização grave envolvendo doença no fígado, doenças neurológicas, diabetes, doenças envolvendo morte celular vascular e artrite reumatóide.

IMUNÓGENO DE RECEPTOR NOTCH-3 PARA GERAÇÃO DE ANTICORPOS

Alvos solúveis ou fragmentos destes podem ser usados como imunógenos para geração de anticorpos. O anticorpo é direcionado contra o alvo de interesse. Preferencialmente, o alvo é um polipeptídeo importante biologicamente e a administração do anticorpo para um mamífero que sofre de uma doença ou disfunção pode resultar em um benefício terapêutico nesse mamífero. Célula inteiras podem ser usadas como imunógeno para fabricar anticorpos. O imunógeno pode ser produzido de forma recombinante ou pelo uso de métodos sintéticos. O imunógeno também pode ser isolado a partir de uma fonte natural.

Para as moléculas de transmembrana, como receptores, fragmentos destes (por exemplo, o domínio extracelular de um receptor) podem ser usados como imunógeno. Alternativamente, células que expressam a molécula de transmembrana podem ser usadas como o imunógeno. Tais células podem ser derivadas de uma fonte natural (por exemplo, linhagem celular de câncer) ou podem ser células que foram transformadas por técnicas recombinantes para superexpressar a molécula de transmembrana. Outras formas de imunógeno úteis para preparar anticorpos serão aparente para os técnicos no assunto.

Alternativamente, um gene ou um cDNA que codifica o receptor Notch3 humano pode ser clonado em um plasmídeo ou outro vetor de expressão em qualquer um dos muitos sistemas de expressão de acordo com métodos conhecidos para os técnicos no assunto. Métodos de clonagem e

expressão do receptor Notch3 e da sequência de ácido nucléico para o receptor Notch3 humano são conhecidos (consulte, por exemplo, patentes US 5.821.332 e 5.759.546). Devido à degeneração do código genético, várias sequências de nucleotídeos que codificam a proteína ou polipeptídeos do receptor Notch3 podem ser usadas. Pode-se variar a sequência de nucleotídeos pela seleção de combinações baseadas nas possíveis escolhas de códons. Estas combinações são feitas de acordo com o código genético da trinca padrão, conforme aplicado para a sequência de nucleotídeo que codifica o receptor Notch3 de ocorrência natural e todas as variações podem ser consideradas. Qualquer um destes polipeptídeos pode ser usado na imunização de um animal para gerar anticorpos que se ligam ao receptor Notch3 humano.

Proteínas Notch3 recombinantes de outras espécies também podem ser usadas como imunógeno para gerar anticorpos devido ao alto grau de conservação da sequência de aminoácido de Notch3. Uma comparação entre Notch3 humana e de camundongo mostrou 90% de identidade de sequência de aminoácido entre as duas espécies.

O imunógeno do receptor Notch3 pode, quando benéfico, ser expresso como uma proteína de fusão que tem o receptor Notch3 ligado a um segmento de fusão. O segmento de fusão frequentemente auxilia na purificação da proteína, por exemplo, permitindo que a proteína de fusão seja isolada e purificada por cromatografia de afinidade, mas também pode ser usada para aumentar a imunogenicidade. Proteínas de fusão podem ser produzidas por cultura celular recombinante transformada com uma fusão de sequência de ácido nucléico que codifica uma proteína, incluindo o segmento de fusão ligado a outra extremidade terminal carboxila ou amino da proteína. Segmentos de fusão podem incluir, mas não se limitam a, regiões Fc da imunoglobulina, glutathione-S-transferase, β -galactosidase, um segmento de

poli-histidina capaz de se ligar a um íon metálico bivalente, e maltose que se liga à proteína.

A proteína do receptor Notch3 recombinante, conforme descrito no Exemplo1, foi usada para imunizar camundongos para gerar os hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais da presente invenção. Polipeptídeos exemplares incluem toda ou uma porção da SEQ ID NO.1 ou variantes destas.

GERAÇÃO DE ANTICORPO

Os anticorpos da presente invenção podem ser gerados por qualquer método adequado conhecido na técnica. Os anticorpos da presente invenção podem compreender anticorpos policlonais. Métodos de preparação de anticorpos policlonais são conhecidos pelos técnicos no assunto (Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988), que é integralmente incorporado ao presente pedido como referência).

Por exemplo, um imunógeno conforme descrito no Exemplo 1 pode ser administrado para vários animais hospedeiros incluindo, mas não se limitando a, camundongos, ratos, etc., para induzir a produção de soro contendo os anticorpos policlonais específicos para o antígeno. A administração do imunógeno pode envolver uma ou mais injeções de um agente imunizante e, se desejado, um adjuvante. Vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo das espécies hospedeiras, e incluem, mas não se limitam a, adjuvante de Freund (completo e incompleto), géis minerais como hidróxido de alumínio, substâncias ativas de superfície como liolecitina, pluronic polióis, poliânions, peptídeos, emulsões oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol e adjuvantes potencialmente úteis como BCG (bacilo Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Exemplos adicionais de adjuvantes que podem ser empregados incluem adjuvante MPL-TDM (Lipídio A monofosforil, trealose dicorinomicolato

sintética). Os protocolos de imunização são bem conhecidos na técnica e podem ser realizados por qualquer método que obtenha uma resposta imune no animal hospedeiro escolhido. Adjuvantes são bem conhecidos na técnica.

Tipicamente, o imunógeno (com ou sem adjuvante) é injetado no mamífero por múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoniais, intramuscular ou intravenosa. O imunógeno pode incluir o polipeptídeo Notch3 ou uma proteína de fusão, ou variantes destes. Dependendo da natureza dos polipeptídeos (isto é, porcentagem de hidrofobicidade, porcentagem de hidrofiliidade, estabilidade, carga da rede, ponto isoelétrico, etc.) eles podem ser úteis para conjugar o imunógeno a uma proteína conhecida por ser imunogênica em um mamífero sendo imunizado. Tal conjugação inclui tanto conjugação química por derivação de grupos químicos funcionais ativos como imunógenos e proteínas imunogênicas a serem conjugados de modo a formar uma ligação covalente, ou através de proteína de fusão com base na metodologia ou outros métodos conhecidos pelos técnicos no assunto. Exemplos de tais proteínas imunogênicas incluem, mas não se limitam a, hemocianina de lapa californiana, albumina do soro, tiroglobulina bovina, inibidor tripsina de soja e peptídeos auxiliares de células T indistintos. Vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica conforme descrito acima.

Os anticorpos da presente invenção podem compreender anticorpos monoclonais. Anticorpos monoclonais são anticorpos que reconhecem um único sítio antigênico. Sua especificidade uniforme faz dos anticorpos monoclonais muito mais úteis do que os anticorpos policlonais, que usualmente contêm anticorpos que reconhecem uma variedade de diferentes sítios antigênicos. Anticorpos monoclonais podem ser preparados usando-se tecnologia de hibridoma, como aquelas descritas por Kohler, *et al.*, *Nature* 256:495 (1975); patente US 4.376.110; Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory*

Manual, Cold spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) e Hammerling, *et al.*, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier (1981), métodos de DNA recombinante ou outros métodos conhecidos pelos técnicos no assunto. Outros exemplos de métodos que podem ser empregados para produzir anticorpos monoclonais incluem, mas não se limitam a, técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor, *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026 (1983)), e técnica de hibridoma de EBV (Cole, *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, páginas 77-96, Alan R. Liss (1985)). Tais anticorpos podem ser de qualquer classe de imunoglobulina incluindo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD e qualquer subclasse destes. O hibridoma que produz o mAb desta invenção pode ser cultivado *in vitro* ou *in vivo*.

No modelo de hibridoma, um hospedeiro como um camundongo ou camundongo humanizado, um camundongo com um sistema imune humano, hamster, coelho, camelo ou qualquer outro animal hospedeiro apropriado é imunizado para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que irão se ligar especificamente à proteína usada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com uma linhagem de células de mieloma, utilizando-se um agente de fusão apropriado, como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, páginas 59-103 (1986)).

Geralmente, para se fazer hibridomas que produzem anticorpos são usados linfócitos de sangue periférico ("PBLs" as células de origem humana são desejadas, ou são usadas células do baço ou células de nódulos linfáticos se fontes de mamíferos não humanas são desejadas. Os linfócitos são então fundidos com uma linhagem celular imortalizada, usando-se um agente de fusão apropriado, como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic

Press, páginas. 59-103 (1986)). Linhagens celulares imortalizadas são usualmente transformadas em células de mamíferos, particularmente células de mieloma de origem de roedor, bovina ou humana. Tipicamente, linhagens celulares de mieloma de rato ou camundongo são empregadas. As células de hibridoma podem ser cultivadas em um meio de cultura adequado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células imortalizadas não unidas. Por exemplo, se as células parentais são desprovidas da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias que previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

Linhagens celulares imortalizadas preferenciais são aquelas que se fundem eficientemente, apóiam a produção de anticorpo de alto nível pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio como meio HAT. Entre estas linhagens celulares de mieloma estão as linhagens de mieloma murino, como aquelas derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis junto ao Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, e SP2/0 ou células X63-Ag8-653 disponíveis junto à Coleção Americana de Tipos de Cultivo (ATCC), Manassas, VA, EUA. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano de camundongo também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133, : 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., páginas 51-63 (1987)). A linhagem celular de mieloma NSO de camundongo também pode ser usada (Coleção Européia de Cultura Celular, Salisbury, Wilshire, Reino Unido).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas é testado para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra

Notch3. A especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma pode ser determinada por imunoprecipitação ou por um teste de ligação *in vitro*, como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Tais técnicas são conhecidas pelos técnicos no assunto. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal para Notch3 pode, por exemplo, ser determinada por meio da análise Scatchard (Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).

Após as células de hibridoma serem identificadas para produção de anticorpos de especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados pela limitação de procedimentos de diluição e cultivados por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, páginas 59-103 (1986)). O meio de cultura adequado para este propósito inclui, por exemplo, Meio de Dulbecco modificado por Eagle (D-MEM) ou meio RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascite em um animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados ou isolados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro, por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais, como por exemplo, proteína A Sefarose, cromatografia sobre hidroxilapatita, cromatografia de exclusão em gel, eletroforese em gel, diálises ou cromatografia de afinidade.

Existe uma variedade de métodos na técnica para a produção de anticorpos monoclonais e, dessa forma, a invenção não está limitada apenas à produção de hibridomas. Por exemplo, os anticorpos monoclonais também podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante, como aqueles descritos na patente US 4.816.567. Neste contexto, o termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo derivado de um único clone de eucarionte, fago ou procarionte. O DNA que codifica os anticorpos

monoclonais da invenção é facilmente isolado e sequenciado usando-se procedimentos convencionais (por exemplo, pelo uso de sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias leve e pesada de anticorpos murino, ou tais cadeias humanas, humanizadas ou outras fontes (Innis, *et al.* In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic (1990), Sanger, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 74:5463 (1977)). As células de hibridoma servem como uma fonte de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que em seguida são transfectados em células hospedeiras, como células *E. coli*, células NOS, células COS de símios, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem a proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O DNA pode ser também modificado, por exemplo, pela substituição das sequências de codificação de domínios constantes de cadeia leve e cadeia pesada humana no lugar das sequências de murino homólogas (patente US 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) ou por ligação covalente para toda ou parte da sequência codificadora de imunoglobulina a um polipeptídeo não imunoglobulina. Tais polipeptídeos não imunoglobulina podem ser substituído pelos domínios constantes de um anticorpo da invenção, ou pode ser substituído por domínios variáveis de um antígeno que combina o sítio de um anticorpo da invenção para criar um anticorpo bivalente quimérico.

Os anticorpos podem ser anticorpos monovalentes. Métodos para preparação de anticorpos monovalentes são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um método envolve expressão recombinante da cadeia leve e cadeia pesada modificada da imunoglobulina. A cadeia pesada é geralmente truncada em qualquer ponto na região Fc, tal que previna a reticulação da cadeia pesada. Alternativamente, resíduos de cisteína relevantes são substituídos por

outro resíduo de aminoácido ou são deletados de modo a prevenir a reticulação.

Fragments de anticorpos que reconhecem epitopos específicos podem ser gerados por técnicas conhecidas. Tradicionalmente, estes
5 fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, por exemplo, Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107(1992) e Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Por exemplo, fragmentos Fab e $F(ab')_2$ da invenção podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, usando-se enzimas como papaína (para produzir
10 fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos $F(ab')_2$). O fragmento $F(ab)_2$ contém a região variável, a região constante da cadeia leve e o domínio CH1 da cadeia pesada. Entretanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de uma biblioteca de
15 fago de anticorpo. Alternativamente, fragmentos $F(ab')_2$ -SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos de $F(ab')_2$ podem ser isolados diretamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a
20 produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para os técnicos no assunto. Em outras realizações, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (Fv) (pedido de patente PCT documento WO 93/16185).

Para alguns tipos de uso, incluindo o uso de anticorpos *in vivo* em humanos e testes de detecção *in vitro*, pode ser desejável o uso de anticorpos
25 quiméricos, humanizados ou humanos. Um anticorpo quimérico é uma molécula na qual diferentes porções do anticorpo são derivadas de espécies animais diferentes, como anticorpos tendo uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal murino e uma região constante da imunoglobulina

humana. Métodos para produção de anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Consulte, por exemplo, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi, *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies, *et al.*, *J Immunol Methods* 125:191 (1989); patentes US. 5.807.715, 4.816.567 e 4.816.397, que são integralmente
5 incorporados ao presente pedido como referência.

Um anticorpo humanizado é projetado para ter maior homologia a uma imunoglobulina humana do que anticorpos monoclonais derivados de animais. A humanização é uma técnica para produzir um anticorpo quimérico em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi
10 substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo geradas em uma espécie não-humana que se liga ao antígeno desejado tendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de espécies não-humanas e regiões de estrutura (FR) de uma molécula de imunoglobulina humana.
15 Frequentemente, os resíduos de estrutura nas regiões de estrutura humanas serão substituídos por resíduos correspondentes da CDR do anticorpo doador para alterar, preferencialmente se ligar ao antígeno. Estas substituições estruturais são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, pela modelação das interações da CDR e resíduos de estrutura para
20 identificar resíduos de estrutura importantes para ligação de antígeno e comparação de sequência para identificar resíduos de estrutura não usuais nas posições específicas. Consulte, por exemplo, patente US 5.585.089; Riechmann, *et al.*, *Nature* 332:323 (1988), que estão integralmente incorporados ao presente pedido como referência. Anticorpos podem ser
25 humanizados usando-se uma variedade de técnicas conhecidas incluindo, por exemplo, enxerto de CDR (patente EP 239.400, publicação PCT documento WO 91/09967, patentes US 5.225.539, 5.530.101, e 5.585.089), *veneering* ou *resurfacing* (patente EP 592.106, patente EP 519.596; Padlan, *Molecular*

Immunology 28:489 (1991); Studnicka, *et al.*, *Protein Engineering* 7:805 (1994); Roguska, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969 (1994)), e mistura de cadeia (patente US 5.565.332).

Geralmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos a partir de uma fonte não-humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente chamados de resíduos "importados", os quais são tipicamente retirados de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se os métodos de Winter e colaboradores ((Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), pela substituição de CDRs ou sequências CDR não-humanas por sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (patente US 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e, possivelmente, alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

É ainda importante que anticorpos sejam humanizados com a manutenção da alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método preferido, anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das seqüências parentais e vários produtos humanizados conceituais que usam modelos tridimensionais das seqüências parentais e humanizadas. Modelos tridimensionais da imunoglobulina estão comumente disponíveis e são familiares para os técnicos no assunto. Programas de computador que ilustram e exibem possíveis estruturas da conformação tridimensional das seqüências

de imunoglobulina candidata selecionada estão disponíveis. A inspeção destas
exibições permite a análise da provável função de certos resíduos no
funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de
resíduos que influenciam na capacidade das sequências de imunoglobulina
candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam na capacidade
candidatas da imunoglobulina se ligar ao seu antígeno. Desta maneira,
resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir do receptor e de
sequências importadas, de forma que a característica desejada do anticorpo,
como o aumento de afinidade para o(s) antígeno(s) alvo(s) seja maximizada,
embora sejam os resíduos CDR que influenciam diretamente ou mais
substancialmente a ligação de antígeno.

A escolha de domínios variáveis humano, tanto leve como
pesado, para serem usados na fabricação de anticorpos humanizados é
importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com um método
exemplar, também conhecido como "melhor ajuste", a sequência do domínio
variável de um anticorpo não-humano é selecionada em relação à biblioteca
completa das sequências conhecidas do domínio variável humano. A
sequência humana mais próxima daquela do anticorpo parental não-humano é
então aceita como FR humana para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, *J.*
Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Outro
método utiliza uma região de estrutura específica derivada a partir da
sequência consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo
específico da cadeia leve ou pesada. A mesma estrutura pode ser utilizada
para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad.*
Sci. U. S. A., 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Anticorpos completamente humanos são particularmente
desejáveis para tratamento terapêutico de pacientes humanos. Anticorpos
humanos podem ser fabricados por uma variedade de métodos conhecidos na

técnica, incluindo métodos de exibição por fago descritos acima, usando-se bibliotecas de anticorpo derivadas de sequências de imunoglobulina humana. Consulte também, patentes US 4.444.887 e 4.716.111; e publicações PCT documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 e WO 91/10741; cada um destes é integralmente incorporado ao presente pedido como referência. As técnicas de Cole *et al.* e Boerner *et al.* estão também disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Riss, página 77 (1985) e Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(86):86 (1991)).

Anticorpos humanos também podem ser produzidos usando-se camundongos transgênicos que são incapazes de expressar imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que podem expressar genes de imunoglobulina humana. Por exemplo, os complexos de gene da cadeia pesada e a cadeia leve da imunoglobulina podem ser introduzidos de maneira aleatória ou por recombinação homóloga em células-tronco embrionárias de camundongo. Alternativamente, a região variável humana, região constante e região de diversidade podem ser introduzidas em células-tronco embrionárias de camundongo em adição aos genes da cadeia leve e da cadeia pesada humanas. Os genes da cadeia leve e da cadeia pesada da imunoglobulina podem ser criados separadamente como não-funcionais ou simultaneamente pela introdução de *loci* de imunoglobulina humana por recombinação homóloga. Em específico, a deleção do homozigoto da região JH evita a produção de anticorpo endógeno. As células-tronco embrionárias modificadas são expandidas e microinjetadas em blastócitos para produzir camundongos quiméricos. Os camundongos quiméricos são então cruzados para produzir proles de homozigotos que expressam anticorpos humanos. Consulte, por exemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:2551 (1993);

Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993) e Duchosal *et al.* *Nature* 355:258 (1992)). Os camundongos transgênicos são imunizados de maneira normal com um antígeno selecionado, por exemplo, um polipeptídeo da invenção completo ou uma porção. Os anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno podem ser obtidos a partir de camundongos transgênicos imunizados usando-se tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humana ancorados pelos camundongos transgênicos se reorganizam durante a diferenciação de células B e subsequentemente são submetidos à troca de classe e mutação somática. Dessa forma, usando-se tal técnica é possível produzir anticorpos IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis. Para uma visão geral desta tecnologia para produção de anticorpos humanos, consulte Lonberg, *et al.*, *Int Rev Immunol* 13:65-93 (1995). Para uma discussão detalhada desta tecnologia para produção de anticorpos humanos, anticorpos monoclonais humanos e protocolos para tais produções consulte, por exemplo, publicações PCT documentos WO 98/24893, WO 92/01047, WO 96/34096, WO 96/33735, patente europeia 0 598 877; patentes US 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318, 5.885.793, 5.916.771 e 5.939.598, que estão integralmente incorporadas ao presente pedido como referência. Além disso, empresas como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San Jose, Calif.) e Medarex, Inc. (Princeton, N.J.) podem fornecer anticorpos humanos direcionados contra um antígeno selecionado usando-se tecnologia similar àquela descrita acima.

MAbs humanos também poderiam ser fabricados pela imunização de camundongos transplantados com leucócitos de sangue periférico humano, esplenócitos ou medula óssea (por exemplo, técnica de Trioma de XTL). Anticorpos completamente humanos que reconhecem um epítipo selecionado podem ser gerados usando-se uma técnica denominada "seleção guiada".

Nesta abordagem um anticorpo monoclonal não-humano selecionado, por exemplo, um anticorpo de camundongo, é usado para guiar a seleção completa de um anticorpo que reconhece o mesmo epitopo (Jespers, *et al.*, *Bio/technology* 12:899 (1988)).

5 Ainda, anticorpos para os polipeptídeos da invenção podem ser, por sua vez, utilizados para gerar anticorpos anti-idiotípicos que “imitam” polipeptídeos da invenção usando-se técnicas bem conhecidas para os técnicos no assunto (consulte, por exemplo, Greenspan, *et al.*, *FASEB J* 7:437 (1989); Nissinoff, *J Immunol* 147:2429 (1991)). Por exemplo, anticorpos que se
10 ligam e competitivamente inibem a multimerização do polipeptídeo e/ou ligação de um polipeptídeo da invenção a um ligante, podem ser usados para gerar anti-idiotipos que “imitam” a multimerização do polipeptídeo e/ou domínio de ligação e, como consequência, se ligam e neutralizam um polipeptídeo e/ou seu ligante. Tais anti-idiotipos neutralizantes ou fragmentos Fab de tais anti-
15 idiotipos podem ser usados em regimes terapêuticos para neutralizar a ligação do polipeptídeo. Por exemplo, tais anticorpos anti-idiotípicos podem ser usados para ligar um polipeptídeo da invenção e/ou ligar seus ligantes/receptores e, dessa forma, bloquear sua atividade biológica.

 Os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos
20 biespecíficos. Os anticorpos biespecíficos são monoclonais, preferencialmente humanos ou humanizados, anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. Na presente invenção, uma das especificidades de ligação pode ser dirigida em direção ao Notch3, a outra pode ser para qualquer antígeno, e preferencialmente para uma proteína de
25 superfície celular, receptor ou subunidade do receptor, antígeno específico do tecido, proteína derivada de vírus, proteína empacotada codificada por vírus, proteína derivada de bactéria ou proteína de superfície bacteriana.

 Métodos para fabricação de anticorpos biespecíficos são bem

conhecidos. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos está baseada na coexpressão de dois pares de cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulinas, sendo que as duas cadeias pesadas possuem especificidades diferentes (Milstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Devido à seleção aleatória de cadeias pesada e leve de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, das quais somente uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta é usualmente realizada pelas etapas da cromatografia de afinidade. Procedimentos similares são divulgados no documento WO 93/08829 e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655 (1991).

Domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação de antígeno-anticorpo) podem ser unidos às sequências do domínio constante da imunoglobulina. Preferencialmente, a fusão é com um domínio constante da cadeia pesada da imunoglobulina, que compreende pelo menos parte das regiões de dobradiça, CH2 e CH3. A primeira região constante da cadeia pesada (CH1) pode conter o sítio necessário para a ligação da cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. Os DNAs que codificam as fusões da cadeia pesada da imunoglobulina e, se desejado, da cadeia leve da imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transformados em um organismo hospedeiro adequado. Para maiores detalhes de geração de anticorpos biespecíficos consulte, por exemplo, Suresh *et al.*, *Meth. in Enzym.*, 121:210 (1986).

Anticorpos heteroconjugados são também contemplados presente invenção. Anticorpos heteroconjugados são compostos de dois anticorpos unidos covalentemente. Tais anticorpos, por exemplo, foram propostos para atingir células do sistema imunológico a células indesejadas (patente US

4.676.980). É contemplado que os anticorpos podem ser preparados *in vitro* usando-se métodos conhecidos na química de proteína sintética, incluindo aqueles envolvendo agentes reticulantes. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas usando-se uma reação de troca de bissulfeto ou pela formação
5 de uma ligação tioéster. Exemplos de reagentes adequados para este propósito incluem iminotiolatos e metil-4-mercaptobutirimidato e aqueles divulgados, por exemplo, na patente US 4.676.980.

Além disso, pode-se gerar anticorpos com domínio único para Notch3. Exemplos desta tecnologia foram descritos no documento WO
10 94/25591 para anticorpos derivados da cadeia pesada de Ig de *Camelidae*, bem como na patente US 2003/0130496 que descreve o isolamento de anticorpos humanos completos com um único domínio a partir de bibliotecas de fago.

Também podem ser criadas moléculas que se ligam a uma única
15 cadeia peptídica na qual as regiões Fc das cadeias pesada e leve estão conectadas. Anticorpos de cadeia única ("scFv") e os métodos para a construção dos mesmos são descritos na patente US 4.946.778. Alternativamente, Fab pode ser construída e expressa por meios similares. Anticorpos completamente ou parcialmente humanos são menos imunogênicos
20 do que os mAbs completos de murinos, e os fragmentos e os anticorpos de cadeia única também são menos imunogênicos.

Anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos, geradas com o uso de técnicas descritas em McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*,
25 *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fago. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa de nM) pela mistura

de cadeias (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779 (1992)), assim como infecções combinatórias e recombinação *in vivo*, como estratégia para a construção de bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265 (1993)). Dessa forma, essas técnicas são alternativas

5 viáveis para técnicas de hibridoma de anticorpos monoclonais tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

O DNA também pode ser modificado, por exemplo, pela substituição das seqüências de domínio constante das cadeias humanas, leve e pesada, no lugar das seqüências homólogas de murino (patente US

10 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc.Natl Acad Sci USA* 81:6851 (1984)).

Outra alternativa é o uso de fusão elétrica ao invés de fusão química para formar hibridomas. Esta técnica é bem estabelecida. Ao invés de fusão, também se pode transformar uma célula B para tornar o uso imortal, por exemplo, vírus Epstein Barr ou um gene de transformação. Consulte, por

15 exemplo, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity," Zurawaki, *et al.*, em *Monoclonal Antibodies*, ed. por Kennett, *et al.*, *Plenum Press*, páginas 19-33. (1980)). MAbs anti-Notch3 podem ser desenvolvidos por roedores imunizados (por exemplo, camundongos, ratos, hamster e porquinho da Índia) com proteína Notch3,

20 proteínas de fusão ou seus fragmentos expressos tanto por sistemas eucariontes como procariontes. Outros animais podem ser usados para a imunização, por exemplo, primatas não-humanos, camundongos transgênicos que expressam imunoglobulinas e camundongos imunodeficientes transplantados com linfócitos B humanos. Hibridomas podem ser gerados por

25 procedimentos convencionais pela fusão de linfócitos B a partir de animais imunizados com células de mieloma (por exemplo, Sp2/0 e NSO), conforme descrito anteriormente (Köhler, *et al.*, *Nature* 256:495 (1975)). Além disso, anticorpos anti-Notch3 podem ser gerados pela seleção de bibliotecas dFv de

cadeia única ou bibliotecas Fab a partir de linfócitos B humanos em sistemas de exibição por fago. A especificidade dos mAbs para Notch3 pode ser testada por ELISA, *immunoblotting* Western ou outras técnicas imunológicas. A atividade inibitória dos anticorpos na ativação de complemento pode ser avaliada por testes hemolíticos, usando-se RBCs sintéticos de galinha ou ovelha para a via de complemento clássica. Os hibridomas nos poços positivos são clonados por diluição limitante. Os anticorpos são purificados para caracterização para especificidade para Notch3 humano pelos testes descritos acima.

IDENTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-NOTCH3

A presente invenção fornece anticorpos monoclonais antagonistas que inibem e neutralizam a ação de Notch3. Em específico, os anticorpos da presente invenção se ligam e inibem a ativação de Notch3. Os anticorpos da presente invenção incluem os anticorpos designados 256A-4 e 256A-8, que são divulgados no presente pedido. A presente invenção também inclui anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo que um destes anticorpos.

Anticorpos anti-Notch3 foram testados pelo teste imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), *Western immunoblotting*, ou outras técnicas imunoquímicas. Os testes realizados para caracterizar os anticorpos individuais são descritos nos Exemplos.

Anticorpos da invenção incluem, mas não se limitam a, anticorpos policlonais, monoclonais, monovalentes biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, quiméricos, anticorpos de cadeia única, anticorpos de domínio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id para os anticorpos da invenção), e fragmentos que se ligam ao epitopo de qualquer um dos acima.

Os anticorpos podem ser fragmentos de anticorpo da invenção

que se ligam ao antígeno e incluem, mas não se limitam a, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fd, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, Fvs ligados a bissulfeto (sdFv) e anticorpos de domínio único que compreendem tanto um domínio VL como VH. Fragmentos de anticorpos que se ligam ao antígeno,
5 incluindo anticorpos de cadeia única, podem compreender as regiões variáveis sozinhas ou em combinação com toda ou uma porção dos seguintes: região de dobradiça, domínios CH1, CH2 e CH3. Os fragmentos que se ligam ao antígeno que compreendem qualquer combinação das regiões variáveis com a região de dobradiça, domínios CH1, CH2 e CH3 também estão incluídos na
10 invenção. Os anticorpos da invenção podem ser de qualquer origem animal, incluindo pássaros e mamíferos. Preferencialmente, os anticorpos são de humanos, primatas não-humanos, roedores (por exemplo, camundongo e rato), burro, ovelha, coelho, cabra, porquinho da Índia, camelo, cavalo ou galinha.

Como usado no presente pedido, "anticorpos humanos" incluem
15 anticorpos que têm a sequência de aminoácido de uma imunoglobulina humana e inclui anticorpos isolados a partir de bibliotecas de imunoglobulina humana ou a partir de animais transgênicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas, conforme descrito abaixo e, por exemplo, na patente US 5.939.598 por Kucherlapati, *et al.*

20 Os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos ou com maior multiespecificidade. Anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epitopos de Notch3 ou podem ser específicos para ambos Notch3, bem como para um epitopo heterólogo, como um polipeptídeo heterólogo ou
25 material de suporte sólido. Consulte, por exemplo, publicações PCT documentos WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, WO 92/05793, Tutt, *et al.*, *J Immunol* 147:60 (1991); patentes US 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920, 5.601.819, Kostelny, *et al.*, *J Immunol* 148:1547 (1992).

Anticorpos da presente invenção podem ser descritos ou especificados em termos de epitopo(s) ou porção(ões) de Notch3 que eles reconhecem ou se ligam especificamente. O(s) epitopo(s) ou porção(ões) do polipeptídeo podem ser especificados conforme descrito, por exemplo, pelas posições N-terminal e C-terminal, pelo tamanho dos resíduos de aminoácidos adjacentes ou listados nas tabelas e figuras.

Anticorpos da presente invenção também podem ser descritos ou especificados em termos de suas inter-reatividades. Anticorpos que se ligam aos polipeptídeos Notch3, que têm pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, pelo menos 60%, pelo menos 55%, e pelo menos 50% de identidade (conforme calculado usando-se métodos conhecidos na técnica e descritos no presente pedido) em relação a Notch3 também são incluídos na presente invenção. Anticorpos anti-Notch3 também podem se ligar a outras proteínas com um KD menor que cerca de 10^{-7} M, menor que cerca de 10^{-6} M, menor que cerca de 10^{-5} M, como anticorpos anti-Notch3 de espécies diferentes daquelas contra as quais o anticorpo anti-Notch3 é dirigido.

Em realizações específicas, os anticorpos da presente invenção interagem com homólogos de Notch3 humano de macaco e com os epitopos correspondentes destes. Em uma realização específica, a inter-reatividade descrita acima é em relação a qualquer polipeptídeo antigênico específico único ou imunogênico, ou combinação(ões) de polipeptídeos antigênicos específicos e/ou imunogênicos divulgados no presente pedido.

Os anticorpos que se ligam aos polipeptídeos codificados por polinucleotídeos que hibridizam com um polinucleotídeo que codifica Notch3 mediante condições de hibridização estridente estão ainda incluídos na presente invenção. Anticorpos da presente invenção também podem ser descritos ou especificados em termos de suas afinidades de ligação a um

polipeptídeo da invenção. Afinidades de ligação preferenciais incluem aquelas com uma constante de equilíbrio de dissociação ou KD de 10^{-8} a 10^{-15} M, 10^{-8} a 10^{-12} M, 10^{-8} a 10^{-10} M, ou 10^{-10} a 10^{-12} M. A invenção também fornece anticorpos que inibem competitivamente a ligação de um anticorpo a um epitopo da invenção, conforme determinado por qualquer método conhecido na técnica para determinar a ligação competitiva, por exemplo, os imunoenaios descritos no presente pedido. Em realizações preferenciais, o anticorpo inibe competitivamente a ligação ao epitopo em pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50%.

VETORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Em outro aspecto, a presente invenção fornece sequências isoladas de ácido nucléico que codificam um anticorpo conforme divulgado no presente pedido, construções de vetores que compreendem uma sequência de nucleotídeo que codifica anticorpos da presente invenção, células hospedeiras que compreendem tal vetor e técnicas recombinantes para a produção do anticorpo.

Para produção de um anticorpo recombinante, o ácido nucléico que o codifica é isolado e inserido em um vetor replicante para posterior clonagem (amplificação do DNA) ou para expressão. O DNA que codifica o anticorpo é facilmente isolado e seqüenciado usando-se procedimentos convencionais (por exemplo, usando-se sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias leves e pesadas do anticorpo). Técnicas padrão para clonagem e transformação podem ser usadas na preparação de linhagens celulares que expressam os anticorpos da presente invenção.

VETORES

Muitos vetores estão disponíveis. Os componentes do vetor

geralmente incluem, mas não se limitam a um ou mais dos seguintes: uma sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento *enhancer*, um promotor e uma sequência de terminação de transcrição. Vetores de expressão recombinantes contendo uma sequência de

5 nucleotídeo que codifica os anticorpos da presente invenção podem ser preparados usando-se técnicas bem conhecidas. Os vetores de expressão incluem uma sequência de nucleotídeos ligadas de forma funcional às sequências de nucleotídeos reguladoras da transcrição ou da tradução como aquelas derivadas de genes de mamíferos, micróbios, vírus ou insetos.

10 Exemplos de sequências reguladoras incluem promotores transcricionais, operadores, *enhancers*, sítios de ligação de mRNA ribossomal e/ou sequências apropriadas que controlam a transcrição e início e terminação da tradução. Sequências de nucleotídeos são "ligadas de forma funcional" quando a sequência reguladora relaciona-se de forma funcional à sequência de

15 nucleotídeos para o polipeptídeo apropriado. Dessa forma, uma sequência de nucleotídeos promotora é ligada de forma funcional, por exemplo, à sequência da cadeia pesada do anticorpo se a sequência de nucleotídeo promotora controla a transcrição da sequência de nucleotídeos apropriada.

Além disso, as sequências que codificam peptídeos-sinal

20 apropriados que não estão naturalmente associados com as sequências das cadeias pesada e/ou leve do anticorpo podem ser incorporadas nos vetores de expressão. Por exemplo, uma sequência de nucleotídeos para um peptídeo-sinal (líder secretório) pode ser unida na fase à sequência do polipeptídeo, de modo a secretar o anticorpos para o espaço periplasmático ou para o meio.

25 Um peptídeo sinal funcional para as células hospedeiras pretendidas aumenta a secreção extracelular do anticorpo apropriado. O peptídeo sinal pode ser clivado a partir do polipeptídeo mediante secreção do anticorpo a partir da célula. Exemplos de tais sinais secretórios são bem conhecidos e incluem, por

exemplo, aqueles descritos nas patentes US 5.698.435, 5.698.417 e 6.204.023.

O vetor pode ser um vetor de plasmídio, um vetor de fago de fita simples ou dupla ou um vetor viral com RNA ou DNA de fita simples ou dupla. Tais vetores podem ser introduzidos nas células como polinucleotídeos por técnicas bem conhecidas para introdução de DNA e RNA nas células. Os vetores, no caso de fago e vetores virais, também podem ser introduzidos nas células como vírus empacotados ou encapsulados por técnicas bem conhecidas para infecção e transdução. Vetores virais podem ser competentes para replicação ou falhos para replicação. No último caso, a propagação viral geralmente apenas ocorrerá completar às células hospedeiras. Os sistemas de tradução livres de células também podem ser empregados para produzir a proteína, usando-se RNAs derivados dos constructos de DNA presentes. Tais vetores podem incluir a sequência de nucleotídeo que codifica a região constante da molécula de anticorpo (consulte, por exemplo, publicações PCT documentos WO 86/05807 e WO 89/01036, e patente US 5.122.464) e o domínio variável do anticorpo pode ser clonado em tal vetor para expressão das cadeias pesada e leve inteiras.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Os anticorpos da presente invenção podem ser expressos a partir de qualquer célula hospedeira adequada. Exemplos de células hospedeiras úteis na presente invenção incluem células procariontes, leveduras ou eucariontes superiores e incluem, mas não se limitam a, micro-organismos como bactérias (por exemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas com DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídio ou cosmídio, vetores de expressão de DNA contendo sequências que codificam anticorpos, leveduras (por exemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas com vetores de expressão em levedura contendo sequências que codificam anticorpos, sistemas celulares infectados com vetores de expressão (por exemplo,

Baculovirus) contendo sequências que codificam anticorpos, sistemas de células vegetais infectadas com vírus recombinantes que expressam vetores (por exemplo, vírus mosaico da couve-flor, CaMV, vírus mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vetores de expressão de plasmídeo recombinante (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo sequências que codificam anticorpos, ou sistemas celulares de mamíferos (por exemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que ancoram constructos de expressão recombinante contendo promotores derivados do genoma de células de mamíferos (por exemplo, promotor metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (por exemplo, o promotor posterior de adenovírus, a vacina do promotor do vírus 7.5K).

Procariontes úteis como células hospedeiras na presente invenção incluem organismos gram negativos ou gram positivos como *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* e *Shigella*, bem como *Bacilli*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*. Um hospedeiro de clonagem *E. coli* preferencial é *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora outras linhagens como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) também são adequadas. Estes exemplos são mais ilustrativos do que limitantes.

Vetores de expressão para uso nas células hospedeiras procariontes geralmente compreendem um ou mais genes marcadores selecionáveis fenotípicos. Um gene marcador selecionável fenotípico é, por exemplo, um gene que codifica uma proteína que confere resistência a antibióticos ou que supre uma necessidade autotrófica. Exemplos de vetores de expressão úteis para células hospedeiras procariontes incluem aqueles derivados de plasmídios comercialmente disponíveis como pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, USA), e o pET (Novagen, Madison, Wisconsin, EUA) e a série de vetores pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Studier, *J Mol Biol* 219:37

(1991); Schoepfer, *Gene* 124:83 (1993)). As sequências promotoras comumente usadas para vetores de expressão de células hospedeiras procariontes recombianantes incluem T7, (Rosenberg, *et al.*, *Gene* 56:125 (1987)), β -lactamase (penicilinase), sistema promotor lactose (Chang, *et al.*, *Nature* 275:615 (1978); Goeddel, *et al.*, *Nature* 281:544 (1979)), sistema promotor triptofano (*trp*) (Goeddel, *et al.*, *Nucl Acids Res* 8:4057 (1980)), e promotor *tac* (Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

Leveduras e fungos filamentosos úteis na presente invenção incluem aqueles dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Trichoderma*, *Neurospora*, e fungos filamentosos como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* e *Aspergillus*. Vetores de levedura frequentemente conterão uma sequência de origem de replicação de um plasmídio de levedura com 2 μ , uma sequência replicante autônoma (ARS), uma região promotora, sequências para poliadenilação, sequências para terminação de transcrição, e um gene marcador selecionável. Exemplos de sequências promotoras para vetores de leveduras incluem, entre outras, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinase (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)) ou outras enzimas glicolíticas (Holland *et al.*, *Biochem* 17:4900 (1978), como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvato decarboxilase, fosfofrutoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase, triosefosfato isomerase, fosfoglicose isomerase e glicoquinase. Outros vetores e promotores adequados para uso na expressão em levedura estão também descritos em Fleer, *et al.*, *Gene* 107:285 (1991). Outros promotores e vetores adequados para leveduras e protocolos de transformação de leveduras são bem conhecidos na técnica. Orotocolos de transformação de leveduras são bem conhecidos na técnica Tal protocolo é

descrito por Hinnen, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 75:1929 (1978). O protocolo de Hinnen seleciona transformantes Trp⁺ em um meio seletivo.

Sistemas de cultura de células hospedeiras de inseto ou de mamíferos também podem ser empregados para expressar anticorpos recombinantes. Em princípio, qualquer cultura celular de eucariontes superiores é viável, tanto cultura de vertebrados como de invertebrados. Exemplos de células de invertebrados incluem células vegetais e de insetos (Luckow, *et al.*, *Bio/Technology* 6:47 (1988); Miller, *et al.*, *Genetics Engineering*, Setlow, *et al.*, eds. Vol. 8, páginas 277-9, Plenum Publishing (1986); Mseda, *et al.*, *Nature* 315:592 (1985)). Por exemplo, sistemas de baculovírus podem ser usados para a produção de proteínas heterólogas. Em um sistema de insetos, o vírus poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) pode ser usado como um vetor para expressar genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência que codifica o anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não-essenciais (por exemplo, o gene poliedrina) do vírus, e colocada sob controle de um promotor AcNPV (por exemplo, o promotor poliedrina). Outros hospedeiros que foram identificados incluem *Aedes*, *Drosophila melanogaster* e *Bombyx mori*. Uma variedade de linhagens virais para transfecção está publicamente disponível, por exemplo, variante L-1 de AcNPV e linhagem Bm-5 de *Bombyx mori* NPV e tais vírus podem ser usados como o vírus no presente pedido de acordo com a presente invenção, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*. Além disso, as culturas de células vegetais de algodão, milho, soja, petúnia, tomate e tabaco também podem ser usadas como hospedeiras.

Células de vertebrados e a propagação de células de vertebrados na cultura (cultura de tecido) tornaram-se um procedimento de rotina. Consulte *Tissue Culture*, Kruse, *et al.*, eds., Academic Press (1973). Exemplos de linhagens hospedeiras de mamíferos úteis são de rim de macaco, linhagem de

rim embrionário humano, células renais de filhote de hamster, células ovarianas de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4216 (1980)), células de Sertoli de camundongo, células de carcinoma cervical humano (HELA), células de rim canino, células pulmonares humanas, células hepáticas humanas, tumor mamário de camundongo e células NS0.

Células hospedeiras são transformadas com os vetores para produção de anticorpos descritos acima e cultivadas em meio convencional de nutriente modificado, conforme apropriado para induzir promotores, sequências controle de transcrição e tradução, selecionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas. Sequências promotoras e sequências *enhancer* comumente usadas são derivadas de vírus polioma, Adenovirus 2, vírus 40 de Símio (SV40) e citomegalovírus humano (CMV). As sequências de DNA derivadas do genoma viral de SV40 podem ser usadas para fornecer outros elementos genéticos para a expressão de um gene estrutural em uma célula hospedeira de mamífero, por exemplo, origem de SV40, promotores iniciais e finais, *enhancer*, *splice*, e sítios de poliadenilação. Promotores virais iniciais e finais são particularmente úteis devido à fácil obtenção a partir do genoma viral como um fragmento que também pode conter uma origem de replicação viral. Vetores de expressão exemplares para uso em células hospedeiras de mamíferos são comercialmente disponíveis.

As células hospedeiras usadas para produzir um anticorpo desta invenção podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis como F10 de Ham (Sigma, St Louis, MO), Meio Essencial Mínimo (MEM, Sigma, St Louis, MO), RPMI-1640 (Sigma, Sigma, St Louis, MO) e Meio Modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM, Sigma, Sigma, St Louis, MO) são adequados para cultivar as células hospedeiras. Além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes US 4.767.704,

4.657.866, 4.560.655, 5.122.469, 5.712.163 ou 6.048.728 podem ser usados como meio de cultura para células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (como insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais (como cloreto de sódio, onde X é sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (como HEPES), nucleotídeos (como adenosina e timidina), antibióticos (como droga GENTAMYCIN™), elementos traço (definidos como componentes inorgânicos usualmente presentes na concentração final em taxa micromolar) e glicose ou uma fonte equivalente de energia. Qualquer outro suplemento necessário também pode ser incluído na concentração apropriada que seria conhecida pelos técnicos no assunto. As condições de cultura, como temperatura, pH e similares, são aquelas previamente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e serão evidentes para um técnico no assunto.

POLINUCLEOTÍDEOS QUE CODIFICAM ANTICORPOS

A invenção fornece, ainda, polinucleotídeos ou ácidos nucléicos, por exemplo, DNA, que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codificam um anticorpo da invenção e fragmentos destes. Polinucleotídeos exemplares incluem aqueles que codificam cadeias de anticorpo que compreendem uma ou mais sequências de aminoácidos descritas no presente pedido. A invenção também engloba polinucleotídeos que hibridizam a polinucleotídeos que codificam um anticorpo da presente invenção mediante condições de hibridização estridentes ou com baixa estridência.

Os polinucleotídeos e a sequência de nucleotídeos dos polinucleotídeos determinados podem ser obtidos por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, se a sequência de nucleotídeos do anticorpo é conhecida, um polinucleotídeo que codifica o anticorpo pode ser montado a partir de oligonucleotídeos sintetizados quimicamente (por exemplo,

conforme descrito em Kutmeier, *et al.*, *Bio/Techniques* 17:242 (1994)), que resumidamente, envolvem a síntese de oligonucleotídeos que se sobrepõem contendo porções da sequência que codifica o anticorpo, anelamento e ligação destes oligonucleotídeos e, então, a amplificação dos oligonucleotídeos ligados por PCR.

Alternativamente, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo pode ser gerado a partir de ácidos nucleicos de uma fonte adequada. Se um clone contendo um ácido nucleico que codifica um anticorpo específico não está disponível, mas a sequência da molécula de anticorpo é conhecida, um ácido nucleico que codifica uma imunoglobulina pode ser sintetizado quimicamente ou obtido a partir de uma fonte adequada (por exemplo, uma biblioteca de cDNA de anticorpo, ou uma biblioteca de cDNA gerada a partir de um ácido nucleico, preferencialmente poli A+ RNA, isolado de qualquer tecido ou células que expressam o anticorpo, como células de hibridoma selecionadas para expressar um anticorpo da invenção) por amplificação por PCR usando-se *primers* sintéticos hibridizáveis às extremidades 3' e 5' da sequência ou por clonagem, usando-se uma sonda de oligonucleotídeos específica para a sequência gênica específica para identificar, por exemplo, um clone de cDNA a partir de uma biblioteca de cDNA que codifica o anticorpo. Ácidos nucleicos amplificados gerados por PCR podem ser, então, clonados em vetores de clonagem replicáveis usando-se qualquer método bem conhecido na técnica.

Uma vez que a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos correspondente do anticorpo é determinada, a sequência de nucleotídeos do anticorpo pode ser manipulada usando-se métodos bem conhecidos na técnica para a manipulação de sequências de nucleotídeos, por exemplo, técnicas de DNA recombinante, mutagênese dirigida ao sítio, PCR, etc. (consulte, por exemplo, a técnica descrita em Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990);

Ausubel, *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1998), ambas as publicações estão integralmente incorporadas ao presente pedido como referência), para gerar anticorpos tendo uma sequência de aminoácido diferente, por exemplo, para criar substituições, deleções e/ou
5 inserções de aminoácidos.

Em uma realização específica, a sequência de aminoácido dos domínios variáveis das cadeias pesada e/ou leve podem ser examinadas para identificar as sequências das CDRs por métodos bem conhecidos, por exemplo, pela comparação com sequências de aminoácidos das regiões
10 variáveis das cadeias pesada e/ou leve para determinar as regiões de hipervariabilidade de sequência. Usando-se técnicas de DNA recombinante de rotina, uma ou mais CDRs podem ser inseridas nas regiões de estrutura, por exemplo, nas regiões de estrutura humanas para humanizar um anticorpo não-humano, conforme descrito acima. As regiões de estrutura podem ser regiões
15 de estrutura de ocorrência natural ou consenso, e preferencialmente regiões de estrutura humanas (consulte, por exemplo, Chothia, *et al.*, *J Mol Biol* 278: 457 (1998) para uma listagem de regiões de estrutura humanas). Preferencialmente, o polinucleotídeo gerado pela combinação das regiões de estrutura e CDRs codifica um anticorpo que especificamente se liga a um
20 polipeptídeo da invenção. Preferencialmente, conforme discutido acima, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser feitas nas regiões de estrutura e, preferencialmente, as substituições de aminoácidos aumentam a ligação do anticorpo ao seu antígeno. Adicionalmente, tais métodos podem ser usados para fazer substituições ou deleções de aminoácidos de um ou mais
25 resíduos de cisteína da região variável que participam de uma ligação bissulfeto entre cadeias para gerar moléculas de anticorpo desprovidas de uma ou mais ligações bissulfeto entre cadeias. Outras alterações no polinucleotídeo são englobadas pela presente invenção e estão dentro da

técnica.

Além disso, podem ser usadas técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos" (Morrison, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 81:851 (1984); Neuberger, *et al.*, *Nature* 312:604 (1984); Takeda, *et al.*, *Nature* 314:452 (1985)) pela combinação de genes de uma molécula de anticorpo de camundongo com especificidade apropriada para o antígeno, junto com genes de uma molécula de anticorpo humano com atividade biológica apropriada. Conforme descrito acima, um anticorpo quimérico é uma molécula na qual diferentes porções do anticorpo são derivadas de espécies animais diferentes, como aqueles que têm uma região variável derivada de um mAb murino e uma região constante da imunoglobulina humana, por exemplo, anticorpos humanizados.

Alternativamente, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (patente US 4.946.778; Bird, *Science* 242:423 (1988); Huston, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879 (1988); e Ward, *et al.*, *Nature* 334:544 (1989)) podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia única. Anticorpos de cadeia única são formados pela ligação de fragmentos das cadeias pesada e leve da região Fv via uma ponte de aminoácido, resultando em um polipeptídeo de cadeia única. Técnicas para montagem de fragmentos Fv funcionais em *E. coli* também podem ser usadas (Skerra, *et al.*, *Science* 242:1038 (1988)).

MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-NOTCH3

Os anticorpos da invenção podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos, em específico, por síntese química ou, preferencialmente, por técnicas de expressão recombinante.

A expressão recombinante de um anticorpo da invenção, fragmento, derivado ou análogo deste (por exemplo, uma cadeia pesada ou

leve de um anticorpo da invenção ou um anticorpo de cadeia única da invenção), necessita da construção de um vetor de expressão contendo um polinucleotídeo que codifica o anticorpo ou um fragmento do anticorpo. Uma vez que um polinucleotídeo que codifica uma molécula de anticorpo tenha sido
5 obtido, o vetor para a produção do anticorpo pode ser produzido por tecnologia de DNA recombinante. Um vetor de expressão é construído contendo as sequências que codificam o anticorpo e sinais apropriados de controle de transcrição e tradução. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas *in vitro* de DNA recombinante, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*.

10 O vetor de expressão é transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais e as células transfectadas são então cultivadas por técnicas convencionais para produzir um anticorpo da invenção. Em um aspecto da invenção, os vetores que codificam tanto as cadeias pesadas como leves podem ser coexpressos na célula hospedeira para expressão da
15 molécula de imunoglobulina inteira, conforme detalhado abaixo.

Vários sistemas de vetor de expressão em hospedeiros podem ser utilizados para expressar as moléculas de anticorpo da invenção conforme descrito acima. Tais sistemas de expressão em hospedeiros representam veículos pelos quais as sequências codificadoras de interesse podem ser
20 produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem expressar uma molécula de anticorpo da invenção *in situ*, quando transformadas ou transfectadas com as sequências codificadoras apropriadas de nucleotídeos. Células bacterianas como *E.coli* e células eucariontes são comumente usadas para a expressão de uma molécula de anticorpo
25 recombinante, especialmente para a expressão da molécula de anticorpo recombinante completa. Por exemplo, células de mamífero como CHO, junto com um vetor como o elemento promotor do principal gene inicial intermediário de citomegalovírus humano, é um sistema de expressão efetivo para humanos

(Foecking, *et al.*, *Gene* 45:101 (1986); Cockett, *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

Além disso, pode ser escolhida uma linhagem celular hospedeira que modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o
5 produto gene na maneira específica desejada. Tais modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem) de produtos proteína podem ser importantes para a função da proteína. Células hospedeiras diferentes têm características e mecanismos específicos para o processo de pós-tradução e modificação de proteínas e produtos do gene.

10 Linhagens celulares apropriadas ou sistemas hospedeiros podem ser escolhidos para garantir a modificação e processamento corretos da proteína estranha expressa. Para este fim, podem ser usadas células hospedeiras eucariontes que possuem a maquinaria celular para o processamento apropriado da transcrição primária, glicosilação e fosforilação do produto do
15 gene. Tais células hospedeiras de mamíferos incluem, mas não se limitam a, CHO, COS, 293, 3T3, ou células de mieloma.

Para uma alta produção em longo prazo de proteínas recombinantes, a expressão estável é preferencial. Por exemplo, linhagens celulares que expressam a molécula de anticorpo de maneira estável podem
20 ser modificadas geneticamente. Ao invés de usar vetores de expressão que contêm origens de replicação virais, as células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão apropriados (por exemplo, promotor, *enhancer*, sequências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.), e um marcador selecionável.
25 Seguindo a introdução do DNA estranho, as células modificadas geneticamente podem ser cultivadas por um ou dois dias em um meio enriquecido e, então, trocadas para um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídio recombinante confere resistência à seleção e permite às células se integrarem

de maneira estável ao plasmídio nos seus cromossomos e crescerem para formar o *loci*, que por sua vez, será clonado e expandido para as linhagens celulares. Este método pode ser usado de forma vantajosa para modificar geneticamente linhagens celulares que expressam a molécula de anticorpo.

5 Tais linhagens celulares modificadas geneticamente podem ser particularmente úteis na seleção e avaliação de compostos que interagem diretamente ou indiretamente com a molécula de anticorpo.

Vários sistemas de seleção podem ser usados incluindo, mas não se limitando a, timidina quinase do vírus *herpes simplex* (Wigler, *et al.*, *Cell* 10 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (Szybalska, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 48:202 (1992)), e adenina fosforibosiltransferase (Lowy, *et al.*, *Cell* 22:817 (1980)) genes podem ser empregados em células tk, hgprt ou aprt, respectivamente. Também, a resistência a antimetabólitos pode ser usada como base de seleção para os genes a seguir: dhfr, que confere

15 resistência ao metotrexato (Wigler, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:357 (1980); O'Hare, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1527 (1981)); gpt, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2072 (1981)); neo, que confere resistência ao aminoglicosídeo G-418 (Wu, *et al.*, *Biotherapy* 3:87 (1991)); e hygromicina (Santerre, *et al.*, *Gene* 30:147 (1984)). Métodos comumente

20 conhecidos na técnica de tecnologia de DNA recombinante podem ser aplicados rotineiramente para selecionar o clone recombinante desejado, e tais métodos são descritos, por exemplo, em Ausubel, *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1993); Kriegler, *Gene Transfer and*

25 *Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press (1990); e nos capítulos 12 e 13, Dracopoli, *et al.*, eds, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons (1994); Colberre-Garapin, *et al.*, *J Mol Biol* 150:1 (1981), que são integralmente incorporados ao presente pedido como referência.

Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados pela amplificação do vetor (para uma revisão, consulte Bebbington, *et al.*, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells," *DNA Cloning*, Vol.3. Academic Press (1987)). Quando um marcador no sistema de vetor que expressa o anticorpo é amplificável, o aumento no nível de inibição presente na cultura celular hospedeira aumentará o número de cópias do gene marcador. Já que a região amplificada está associada com o gene do anticorpo, a produção do anticorpo também aumentará (Crouse, *et al.*, *Mol Cell Biol* 3:257 (1983)).

A célula hospedeira pode ser co-transfectada com dois vetores de expressão da invenção, o primeiro vetor que codifica um polipeptídeo derivado da cadeia pesada e o segundo vetor que codifica um polipeptídeo derivado da cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores selecionáveis idênticos que são capazes de ter a mesma expressão de polipeptídeos das cadeias pesada e leve. Alternativamente, pode ser usado um único vetor que codifica e é capaz de expressar tanto os polipeptídeos da cadeia pesada como leve. Nestas situações, a cadeia leve deveria ser colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de cadeia pesada livre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322:52 (1986); Kohler, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2 197 (1980)). As sequências codificadoras para as cadeias pesada e leve podem compreender cDNA ou DNA genômico.

Uma vez que a molécula de anticorpo da invenção tenha sido produzida por um animal, sintetizada quimicamente ou expressa de maneira recombinante, esta pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para a purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade, particularmente por afinidade para o antígeno específico após Proteína A, e cromatografia de exclusão por tamanho), centrifugação, diferencial de solubilidade, ou por

qualquer outra técnica padrão para purificação de proteínas. Além disso, os anticorpos da presente invenção ou fragmentos destes podem ser unidos às sequências polipeptídicas heterólogas descritas no presente pedido ou, de outra forma, conhecidas na técnica para facilitar a purificação.

5 A presente invenção engloba anticorpos unidos de maneira recombinante ou conjugados quimicamente a um polipeptídeo (incluindo tanto conjugações covalentes como não-covalentes). Os anticorpos unidos ou conjugados da presente invenção podem ser usados para facilitar a purificação. Consulte, por exemplo, publicação PCT documento WO 93/21232; patente EP
10 439.095; Naramura, *et al.*, *Immunol Lett* 39:91 (1994); patente US 5.474.961; Gillies, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1428 (1992); Fell, *et al.*, *J Immunol* 146:2446 (1991), que são integralmente incorporadas ao presente pedido como referência.

Além disso, os anticorpos ou fragmentos destes da presente
15 invenção podem ser unidos às sequências marcadoras, como um peptídeo para facilitar a purificação. Em realizações preferenciais, a sequência de aminoácido marcadora é um peptídeo hexa-histidina, como um marcador fornecido em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., Valencia, CA), entre outros, muitos destes são comercialmente disponíveis. Conforme descrito em Gentz, *et al.*,
20 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:821 (1989), por exemplo, hexa-histidina fornece purificação conveniente da proteína de fusão. Outros marcadores peptídicos úteis para purificação incluem, mas não se limitam ao marcador "HA", que corresponde a um epitopo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson, *et al.*, *Cell* 37:767 (1984)) e o marcador "flag".

PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO

25 Quando técnicas recombinantes são utilizadas, um anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplasma ou diretamente secretado em um meio. Se o anticorpo é produzido intracelularmente, como

um primeiro passo, o fragmento particulado, tanto das células hospedeiras como fragmentos lisados, podem ser removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163 (1992) descreve um procedimento para isolar anticorpos que são secretados no espaço periplasma de *E.coli*. Resumidamente, a pasta celular é derretida na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) por cerca de 30 minutos. Fragmentos celulares podem ser removidos por centrifugação. Quando o anticorpo é secretado no meio, sobrenadantes de tais sistemas de expressão são, geralmente, primeiro concentrados usando-se um filtro de concentração de proteína disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease como PMSF pode ser incluído em qualquer uma das etapas anteriores, para inibir proteólises, e antibióticos podem ser incluídos para evitar o crescimento de contaminantes imprevistos.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada usando-se, por exemplo, cromatografia em hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia por afinidade, com cromatografia por afinidade sendo a técnica de purificação preferencial. A adequação da proteína A como um ligante de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer domínio Fc da imunoglobulina que está presente no anticorpo. A proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são baseados em cadeias pesadas de IgG1, IgG2 ou IgG4 humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isótopos de camundongo e para IgG3 humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567 (1986)). A matriz na qual o ligante de afinidade é unido é frequentemente agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, como vidro poroso controlado ou poli(estireno-divinil)benzeno, permitem velocidades mais rápidas de fluxo e tempo de processamento mais curto do que aquele que

pode ser alcançado com agarose. Quando o anticorpo compreende um domínio C_H3, a resina Bakerbond ABXTM™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para a purificação. Outras técnicas para purificação de proteína, como fracionamento em uma coluna de troca iônica, precipitação em etanol, HPLC de Fase Reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™, cromatografia em uma resina de troca aniônica ou catiônica (como uma coluna de ácido poliaspártico), *chromatofocusing*, SDS-PAGE e precipitação em sulfato de amônio estão também disponíveis, dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Após qualquer etapa de purificação preliminar, a mistura que compreende o anticorpo de interesse e os contaminantes pode ser submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em pH baixo, usando-se um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,5 a 4,5, preferencialmente realizada em baixas concentrações de sal (por exemplo, de cerca de 0 a 0,25M de sal).

FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Formulações terapêuticas do polipeptídeo ou anticorpo podem ser preparadas para armazenamento como formulações liofilizadas ou soluções aquosas, pela mistura do polipeptídeo tendo o grau de pureza desejado com carreadores, excipientes ou estabilizantes "farmaceuticamente aceitáveis" tipicamente empregados na técnica (todos estes são chamados de "excipientes"), isto é, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes não-iônicos, antioxidantes, e outros aditivos. Consulte *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Oslo, A. Ed. (1980). Tais aditivos não devem ser tóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações empregadas.

Agentes tamponantes ajudam a manter o pH na faixa próxima das condições fisiológicas. Eles preferencialmente estão presentes em

concentrações na faixa de cerca de 2 mM a cerca de 50 mM. Agentes tamponantes adequados para uso na presente invenção incluem ácidos orgânicos e inorgânicos e sais destes como tampões citrato (por exemplo, mistura de citrato monossódico-citrato dissódico, mistura de ácido cítrico-citrato dissódico, mistura de ácido cítrico-citrato trissódico, mistura de ácido cítrico-citrato monossódico, etc.), tampões succinato (por exemplo, mistura de ácido succínico-succinato monossódico, ácido succínico-hidróxido de sódio, ácido succínico-succinato dissódico, etc.), tampões tartrato (por exemplo, mistura de ácido tartárico-tartrato de sódio, mistura de ácido tartárico-tartrato de potássio, mistura de ácido tartárico-hidróxido de sódio, etc.), tampões fumarato (por exemplo, mistura de ácido fumárico-fumarato monossódico, mistura de ácido fumárico-fumarato dissódico, mistura de fumarato monossódico-fumarato dissódico, etc.), tampões gluconato (por exemplo, mistura de ácido glucônico-gluconato de sódio, mistura de ácido glucônico-hidróxido de sódio, mistura de ácido glucônico-gluconato de potássio, etc.), tampão oxalato (por exemplo, mistura de ácido oxálico-oxalato de sódio, mistura de ácido oxálico-hidróxido de sódio, mistura de ácido oxálico-oxalato de potássio, etc.), tampões lactato (por exemplo, mistura de ácido láctico-lactato de sódio, mistura de ácido láctico-hidróxido de sódio, ácido láctico-hidróxido de potássio, etc.) e tampões acetato (por exemplo, mistura de ácido acético-acetato de sódio, mistura de ácido acético-hidróxido de sódio, etc.). Adicionalmente, pode ser mencionado tampões fosfato, tampões histidina e sais de trimetilamina como Tris.

Podem ser adicionados conservantes em quantidade na faixa de 0,2% a 1% (p/v) para retardar o crescimento microbiano. Conservantes adequados para uso na presente invenção incluem fenol, álcool benzílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloreto de amônio de octadecildimetilbenzil, halóides de benzalcônio (por exemplo, cloreto, brometo, iodeto), cloreto de hexametônio, e alquil parabenos como metil ou propil

parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol e 3-pentanol.

Isotonificantes, algumas vezes conhecidos como “estabilizantes” podem ser adicionados para garantir a isotonicidade de composições líquidas da presente invenção e incluem álcoois de açúcar polihídricos, preferencialmente trihídricos ou açúcares superiores, como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol e manitol.

Estabilizantes se referem a uma ampla categoria de excipientes que podem variar na função de um agente espessante até um aditivo que solubiliza o agente terapêutico ou ajuda a prevenir a desnaturação ou aderência à parede do recipiente. Estabilizantes típicos podem ser álcoois de açúcares polihídricos (enumerados acima); aminoácidos como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico, treonina, etc.; açúcares orgânicos ou álcoois de açúcar, como lactose, trealose, estaquiose, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisitol, galactitol, glicerol e similares, incluindo ciclitóis como inositol; polietileno glicol; polímeros de aminoácidos; enxofre contendo agentes de redução, como uréia, glutatona, ácido tióctico, tioglicolato de sódio, tioglicerol, alfa-monotioglicerol e tiosulfato de sódio; polipeptídeos de baixo peso molecular (isto é, <10 resíduos); proteínas como albumina do soro humano, como albumina do soro bovino, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, polivinilpirrolidona, monossacarídeos como xilose, manose, frutose, glicose; dissacarídeos como lactose, maltose, sacarose e trissacarídeos como rafinose; e polissacarídeos como dextrano. Estabilizantes podem estar presentes na faixa de 0,1 a 10.000 em peso por parte do peso da proteína ativa.

Tensoativos ou detergentes não-iônicos (também conhecidos como “agentes umectantes”) podem ser adicionados para ajudar a solubilizar o agente terapêutico, bem como para proteger a proteína terapêutica contra

agregação induzida pela agitação, que também permite que a formulação seja exposta à pressão de cisalhamento de superfície sem causar desnaturação na proteína. Tensoativos não-iônicos adequados incluem polisorbatos (20, 80, etc.), polioxâmeros (184, 188 etc.), Pluronic.RTM., polióis, polioxietileno sorbitan monoéteres (TWEEN-20®, TWEEN-80®, etc.). Tensoativos não-iônicos podem estar presentes na faixa de cerca de 0,05 mg/ml a cerca de 1,0 mg/ml, preferencialmente de cerca de 0,07 mg/ml a cerca de 0,2 mg/ml.

Outros excipientes adicionais incluem agentes espessantes (por exemplo, amido), agentes quelantes (por exemplo, EDTA), antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) e cosolventes. A formulação no presente pedido pode, também, conter mais de um componente ativo, de acordo com o necessário para a indicação específica sendo tratada, de preferência, aqueles com atividades complementares que não afetem contrariamente um ao outro. Por exemplo, pode ser desejável fornecer também um agente imunossupressor. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação e nas quantidades efetivas para o propósito pretendido. Os ingredientes ativos também podem ser colocados em microcápsula preparada, por exemplo, por técnicas de coaservação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de distribuição de droga coloidal (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas estão divulgadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Osal, A. Ed. (1980).

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente realizado por filtração através de membranas estéreis de filtração. Preparações de liberação contínua podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação contínua

incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contêm o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos modelados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactídeos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinil não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tal como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímeros ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)- 3-hidroxibutírico. Enquanto polímeros como acetato de etileno-vinil e ácido láctico-ácido glicólico permitem liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Anticorpos quando encapsuladas permanecem no corpo por um longo tempo, eles podem denaturar ou agregar como um resultado de exposição à umidade a 37°C, que resulta em uma perda de atividade biológica e possíveis mudanças na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser desenvolvidas para a estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação revela formação de ligação S-S intermolecular através de intercâmbio tio-bissulfeto, a estabilização pode ser alcançada pela modificação de resíduos sulfidril, liofilização de soluções ácidas, controle da umidade do conteúdo, uso apropriado dos aditivos e desenvolvimento de composições de matriz polimérica específica.

A quantidade de polipeptídeo terapêutico, anticorpo ou fragmento deste que serão efetivos no tratamento de uma disfunção ou condição específica dependerá da natureza da disfunção ou condição, e pode ser determinada por técnicas clínicas padrão. Quando possível, é desejável determinar a curva de resposta à dose e as composições farmacêuticas da invenção, primeiro *in vitro* e depois em sistemas de modelo animal úteis, antes

dos testes em humanos.

Em uma realização preferencial, uma solução aquosa do polipetídeo terapêutico, anticorpo ou fragmento deste é administrado por injeção subcutânea. Cada dose pode estar na faixa de cerca de 0,5 µg a cerca
5 de 50 µg por quilograma de peso corporal, ou mais, preferencialmente, de cerca de 3 µg a cerca de 30 µg por quilograma de peso corporal.

A programação de dosagem para administração subcutânea pode variar de uma vez ao mês até diariamente, dependendo do número de fatores clínicos, incluindo o tipo de doença, severidade da doença, e sensibilidade do
10 sujeito para o agente terapêutico.

USOS TERAPÊUTICOS DE ANTICORPOS ANTI-NOTCH-3

É contemplado que os anticorpos da presente invenção podem ser usados para tratar um mamífero. Em uma realização, o anticorpo é administrado a um mamífero não-humano para os propósitos de obtenção dos
15 dados pré-clínicos, por exemplo. Mamíferos não humanos exemplares a serem tratados incluem primatas não-humanos, cachorros, gatos, roedores e outros mamíferos, com os quais estudos pré-clínicos são realizados. Tais mamíferos podem ser modelos animais bem estabelecidos para uma doença a ser tratada com o anticorpo ou podem ser usados no estudo de toxicidade do anticorpo de
20 interesse. Em cada uma dessas realizações, os estudos de escala de dose devem ser realizados no mamífero.

Um anticorpo, com ou sem uma porção terapêutica conjugada a ele, administrado sozinho ou em associação com fator(es) citotóxico(s), pode ser usado como um terapêutico. A presente invenção é direcionada para
25 terapias baseadas em anticorpos que envolvem a administração dos anticorpos da invenção para um animal, um mamífero ou um humano para tratar uma doença, disfunção ou condição mediada por Notch3. O animal ou paciente pode ser um mamífero que necessite de um tratamento específico, como um

mamífero que foi diagnosticado com uma disfunção específica, por exemplo, relacionado ao Notch3. Os anticorpos direcionados contra Notch3 são úteis contra o câncer e outras doenças associadas ao Notch3, incluindo disfunções neurológicas, diabetes, artrite reumatóide, doenças vasculares e síndrome de Alagille em mamíferos, incluindo, mas não se limitando a vacas, porcos, cavalos, galinhas, gatos, cachorros, primatas não-humanos, bem como em humanos. Por exemplo, pela administração de uma dose terapêuticamente aceitável de um anticorpo anti-Notch3 ou anticorpos, da presente invenção, ou um coquetel dos presentes anticorpos, ou em combinação com outros anticorpos de fontes variadas, os sintomas da doença podem ser melhorados ou evitados no mamífero tratado, particularmente humano.

Os compostos terapêuticos da invenção incluem, mas não se limitam, aos anticorpos da invenção (incluindo fragmentos, análogos e derivados destes conforme descrito no presente pedido) e os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da invenção conforme descritos abaixo (incluindo fragmentos, análogos e derivados destes e anticorpos anti-idiotípicos conforme descrito no presente pedido). Os anticorpos da invenção podem ser usados para tratar, inibir ou prevenir doenças, disfunções ou condições associadas com a expressão anormal e/ou atividade do Notch3, incluindo, mas não se limitando a uma ou mais das doenças, disfunções ou condições descritas no presente pedido. O tratamento e/ou prevenção das doenças, disfunções ou condições associadas com a expressão anormal e/ou com a atividade do Notch3 inclui, mas não se limita ao alívio de pelo menos um sintoma associado com essas doenças, disfunções ou condições. Os anticorpos da invenção podem ser fornecidos em composições farmacêuticamente aceitáveis, como conhecido na técnica ou conforme descrito no presente pedido.

Os anticorpos anti-Notch3 da presente invenção podem ser usados terapêuticamente em uma variedade de doenças. A presente invenção

fornece um método para a prevenção ou tratamento de doenças mediadas por Notch3 em um mamífero. O método compreende a administração de uma quantidade de anticorpo anti-Notch3 que previne ou trata o mamífero. O anticorpo anti-Notch3 se liga ao Notch3 e antagoniza a sua função. A sinalização Notch3 tem sido ligada a vários cânceres (Haruki, *et al.*, *Cancer Res* 65:3555 (2005); Park, *et al.*, *Cancer Res* 66:6312 (2006); Lu, *et al.*, *Clin Cancer Res* 10:3291 (2004)); Hedvat, *et al.*, *Br J Haematol* 122:728 (2003); Buchler, *et al.*, *Ann Surg* 242:791 (2005)); Bellavia, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3788 (2002); Screpanti, *et al.*, *Trends Mol Med* 9:30 (2003)); van Limpt, *et al.*, *Cancer Lett* 228:59 (2005)), disfunções neurológicas (Joutei, *et al.*, *Nature* 383:707 (1996)), diabetes (Anastasi, *et al.*, *J Immunol* 171:4504 (2003), artrite reumatóide (Yabe, *et al.*, *J Orthop Sci* 10:589 (2005)), disfunções vasculares relacionadas a doenças (Sweeney, *et al.*, *FASEB J* 18:1421 (2004)) e síndrome de Alagille (Flynn, *et al.*, *J Pathol* 204:55 (2004)). Os anticorpos anti-Notch3 também serão eficazes para prevenir as doenças mencionadas acima.

A quantidade do anticorpo que será eficaz no tratamento, inibição e prevenção de uma doença ou disfunção associada com a expressão anormal e/ou atividade do Notch3 pode ser determinada pelas técnicas clínicas padrão. A dosagem dependerá do tipo de doença a ser tratada, da severidade e da evolução da doença, se o anticorpo for administrado para prevenção ou para propósitos terapêuticos, terapia anterior, o histórico clínico e resposta do paciente ao anticorpo, e o critério de atendimento médico. O anticorpo pode ser administrado nos regimes de tratamento de acordo com a doença, por exemplo, dose única ou poucas doses de um há vários dias para melhorar um estado da doença ou doses periódicas durante um tempo extenso para inibir a progressão da doença e prevenir a recidiva da doença. Além disso, os testes *in vitro* podem ser empregados opcionalmente para ajudar a identificar as

variações de dosagem ideais. A dose precisa a ser empregada na formulação também dependerá da via de administração, da gravidade da doença ou da disfunção e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico em cada circunstância do paciente. As doses eficazes podem ser extrapoladas a partir das curvas de resposta à dose dos sistemas de teste de modelo *in vitro* ou animal.

Para anticorpos, a dose administrada a um paciente é tipicamente de 0,1 mg/kg a 150 mg/kg por peso corporal do paciente. Preferencialmente, a dose administrada a um paciente está entre 0,1 mg/kg e 20 mg/kg por peso corporal do paciente, com mais preferência de 1 mg/kg a 10 mg/kg por peso corporal do paciente. De modo geral, os anticorpos humanos têm uma meia-vida mais longa no corpo humano que os anticorpos de outras espécies devido à resposta imunológica aos polipeptídeos estranhos. Assim, as doses mais baixas de anticorpos humanos e a administração menos frequente é muitas vezes possível. Ainda, a dose e a frequência de administração dos anticorpos da invenção podem ser reduzidas pelo aumento da absorção e penetração no tecido (por exemplo, no cérebro) dos anticorpos pelas modificações como, por exemplo, lipidação. Para administrações repetidas por vários dias ou por mais tempo, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que uma supressão desejada dos sintomas da doença ocorra. Entretanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorado pelas técnicas e testes convencionais.

A composição do anticorpo será formulada, dosada e administrada de acordo com as boas praticas médicas. Os fatores para consideração neste contexto incluem a disfunção específica a ser tratada, o mamífero específico a ser tratado, a condição clínica do paciente individualmente, a causa da disfunção, o local de administração do agente, o método de administração, o cronograma de administração e outros fatores

conhecidos pelos médicos. A “quantidade terapeuticamente eficaz” do anticorpo a ser administrada será orientada por tais considerações, e é a quantidade mínima necessária para prevenir, melhorar ou tratar a doença ou disfunção. O anticorpo não precisa ser, mas é opcionalmente formulado com um ou mais agentes atualmente utilizados para prevenir ou tratar a disfunção em questão. A quantidade eficaz destes outros agentes depende da quantidade de anticorpo presente na formulação, do tipo de disfunção ou tratamento e dos outros fatores discutidos acima. Estes geralmente são utilizados nas mesmas doses e com as vias de administração como previamente mencionado ou de cerca de 1 a 99 % das doses empregadas citadas anteriormente.

Os anticorpos da invenção podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outros tipos de tratamento para câncer, incluindo os agentes quimioterapêuticos convencionais (paclitaxel, carboplatina, cisplatina e doxorubicina), agentes anti-EGFR (gefitinibe, erlotinibe e cetuximabe), agentes anti-angiogênicos (bevacizumabe e sunitinibe), bem como agentes de modulação imunológica como interferon- α e talidomida.

Em um aspecto preferencial, o anticorpo é substancialmente purificado (por exemplo, substancialmente livre das substâncias que limitam seus efeitos ou produzem efeitos colaterais indesejados).

Vários sistemas de entrega são conhecidos e podem ser utilizados para administrar um anticorpo da presente invenção, incluindo injeção, por exemplo, encapsulação em lipossomos, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar o composto, endocitose mediada pelo receptor (consulte, por exemplo, Wu, *et al.*, *J Biol Chem* 262:4429 (1987)), construção de um ácido nucléico como parte de um retrovírus ou outro vetor etc.

O anticorpo anti-Notch3 pode ser administrado a um mamífero de

uma maneira aceitável. Os métodos de introdução incluem, mas não se limitam a, via parenteral, subcutânea, intraperitonial, intrapulmonar, intranasal, epidural, inalação e oral e se desejado para o tratamento imunossupressor, administração intralesional. As infusões parenterais incluem administração intramuscular, intradérmica, intravenosa, intra-arterial, intraperitonial. Os anticorpos ou as composições podem ser administrados por uma rota conveniente, por exemplo, por infusão ou injeção bólus, pela absorção através dos revestimentos internos epiteliais ou subcutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal ou intestinal etc.) e podem ser administradas junto com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local. Além disso, pode ser desejável induzir os anticorpos ou composições terapêuticos da invenção no sistema nervoso central por qualquer rota adequada, incluindo injeção intraventricular ou intratecal; injeção intraventricular pode ser facilitada por um cateter intraventricular, por exemplo, acoplado a um reservatório, como um reservatório Ommaya. Além disso, o anticorpo é administrado por infusão em pulsos, particularmente com doses decrescentes do anticorpo. A dose é preferencialmente administrada por injeções, com a máxima preferência, injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte se a administração é breve ou crônica.

A administração pulmonar também pode ser empregada, por exemplo, pelo uso de um inalador ou nebulizador, e a formulação com um agente aerossol. O anticorpo também pode ser administrado nos pulmões de um paciente na forma de uma composição em pó seco (Consulte, por exemplo, patente US 6.514.496).

Em uma realização, pode ser desejável administrar os anticorpos ou composições terapêuticas da invenção localmente para a área com necessidade de tratamento; isto pode ser alcançado, por exemplo, e não se limitando a, infusão local, aplicação tópica, por injeção, por meio de um cateter,

por meio poroso, não poroso, ou material gelatinoso, incluindo membranas, como membranas *sialastic* ou fibras. Preferencialmente, ao administrar um anticorpo da invenção, deve-se tomar cuidado com o uso de materiais que a proteína não absorve.

5 Em outra realização, o anticorpo pode ser entregue em uma vesícula, em particular um lipossomo (consulte, Langer, *Science* 249:1527 (1990); Treat, *et al.*, em *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein, *et al.*, eds., pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, páginas 317-27; consulte em geral *ibid.*).

10 Em ainda outra realização, o anticorpo pode ser entregue em um sistema de liberação controlada. Em uma realização, uma bomba pode ser utilizada (consulte, Langer, *Science* 249:1527 (1990); Sefton, *CRC Crit Ref Biomed Eng* 14:201 (1987); Buchwald, *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek, *et al.*, *N Engl J Med* 321: 574 (1989)). Em outra realização, os materiais
15 polimérico pode ser usados (consulte *Medical Applications of Controlled Release*, Langer, *et al.*, eds., CRC Press (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen, *et al.*, eds., Wiley (1984); Ranger, *et al.*, *J Macromol Sci Rev Macromol Chem* 23:61 (1983); consulte também Levy, *et al.*, *Science* 228:190 (1985); During, *et al.*, *Ann Neurol* 25:351
20 (1989); Howard, *et al.*, *J Neurosurg* 71:105 (1989)). Em outra realização, um sistema de liberação controlada pode ser colocado próximo ao alvo terapêutico.

 A presente invenção também fornece composições farmacêuticas. Tais composições compreendem uma quantidade terapeuticamente efetiva do anticorpo e um carreador fisiologicamente aceitável. Em uma realização
25 específica, o termo “fisiologicamente aceitável” significa aprovado por uma agência regulatória federal ou uma declaração do governo ou listada nos EUA. A farmacopéia ou outra farmacopéia geralmente reconhecida para uso em animais e mais especificamente em humanos. O termo “carreador” refere-se a

um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o terapêutico é administrado. Tais carreadores fisiológicos podem ser líquidos estéreis, como água e óleos, incluindo aqueles de origem petrolífera, animal, vegetal ou sintética, como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similares. A água é um carreador preferencial quando a composição farmacêutica é administrada por via intravenosa. As soluções salinas e as soluções de dextrose aquosa e de glicerol também podem ser empregadas como carreadores líquidos, especificamente para soluções injetáveis. Os excipientes farmacêuticos adequados, incluindo amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha de trigo, calcário, sílica gel, estearato de sódio, monoestearato glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado seco, glicerol, propileno glicol, água, etanol e similares. A composição, se desejado, também pode conter quantidades menores de agentes umectantes ou emulsificantes, ou agentes tamponantes de pH. Essas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsões, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, formulações de liberação contínua e similares. A composição pode ser formulada como um supositório, com ligantes e carreadores tradicionais, como triglicerídeos. A formulação oral pode incluir carreadores padrão, como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio etc. Exemplos dos carreadores adequados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tais composições conterão uma quantidade efetiva do anticorpo, preferencialmente na forma purificada, junto com uma quantidade adequada do carreador de modo a fornecer a forma para administração adequada ao paciente. A formulação deve ser adequada ao modo de administração.

Em uma realização, a composição é formulada de acordo com os procedimentos de rotina, como uma composição farmacêutica adaptada pela

administração intravenosa aos seres humanos. Tipicamente, as composições para administração intravenosa são soluções em tampão aquoso isotônico estéril. Quando necessário, a composição também pode incluir o agente de solubilização e um anestésico local, como lidocaína para aliviar a dor no local da injeção. Geralmente, os ingredientes são fornecidos separadamente ou misturados na unidade da forma de dosagem, por exemplo, como um pó liofilizado ou concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente fechado, como uma ampola ou sachê indicando a quantidade do agente ativo. Quando a composição é administrada por infusão, pode ser dispensada com uma garrafa de infusão que contém solução salina ou água de grau farmacêutico estéril. Quando a composição é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina pode ser fornecida para que os ingredientes possam ser misturado antes da administração.

A invenção também fornece um kit ou embalagem farmacêutica que compreende um ou mais recipientes preenchidos com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente, um aviso pode estar associado com tais recipiente(s) na forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação pela agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

Além disso, os anticorpos da presente invenção podem ser conjugados a várias moléculas efetoras, como os polipeptídeos heterólogos, drogas, radionucleotídeos ou toxinas. Consulte, por exemplos, as publicações PCT documentos WO 92/08495, WO 91/14438, WO 89/12624, patente US 5.314.995 e patente EP 396.387. Um anticorpo ou fragmento deste pode ser conjugado a um componente terapêutico, como uma citotoxina (por exemplo, um agente citostático ou citocidal), um agente terapêutico ou um íon metálico radioativo (por exemplo, emissores alfa, como, por exemplo, ^{213}Bi). Um

agente de citotoxina ou citotóxico inclui qualquer agente que seja prejudicial às células. Os exemplos incluem paclitaxol, citochalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinbastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, diidróxido diona antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puomicina e análogos ou homólogos destes. Os agentes terapêuticos incluem, mas não se limitam a, antimetabólicos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSMU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclina (por exemplo, daunorrubicina (formalmente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (formalmente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes antimitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina).

As técnicas para conjugação como componentes terapêuticos para anticorpos são bem conhecidas, consulte, por exemplo, Arnon, *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld, *et al.* (eds.), páginas 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom, *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", em *Controlled Drug Delivery*, 2ª ed., Robinson, *et al.*, eds., páginas 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," em *Monoclonal Antibodies 84 : Biological And Clinical Applications*, Pinchera, *et al.*, eds., páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," em *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, Baldwin, *et al.*, eds., páginas 303-16, Academic Press (1985); e

Thorpe, *et al.*, *Immunol Rev* 62:119 (1982). Alternativamente, um anticorpo pode ser conjugado a uma segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo. Consulte, por exemplo, patente US 4.676.980.

Os conjugados da invenção podem ser usados para modificar uma dada resposta biológica, o agente terapêutico ou o componente droga não deve ser entendido como limitado a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, o componente droga pode ser uma proteína ou polipeptídeo que possui uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas ou toxina de difteria; uma proteína como o fator de necrose tumoral, α -interferon, β -interferon, fator de crescimento do nervo, fator de crescimento derivado de plaquetas, ativador de plasminogênio do tecido, um agente apoptótico, por exemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I (Consulte, Publicação Internacional documento WO 97/33899), AIM II (Consulte, Publicação Internacional documento WO 97/34911), Ligante Fas (Takahashi, *et al.*, *Int Immunol*, 6:1567 (1994)), VEGI (Consulte, Publicação Internacional documento WO 99/23105); um agente trombótico; um agente antiangiogênico, por exemplo, angiostatina ou endostatina, ou modificadores de resposta biológica como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator de estimulação de colônia de macrófagos de granulócitos ("GM-CSF"), fator de estimulação de colônia de granulócito ("GM-CSF"), fator de estimulação de colônia de granulócito ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento.

ARTIGOS DE FABRICAÇÃO

Em outra realização da invenção, é fornecido um artigo de fabricação contém materiais úteis para o tratamento das disfunções descritas acima. O artigo de fabricação compreende um recipiente e um rótulo. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e

tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados por uma variedade de materiais, como vidro ou plástico. O recipiente acomoda uma composição que é efetiva para a prevenção ou tratamento da condição e pode ter uma entrada de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que tem uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O agente ativo na composição é o anticorpo. O rótulo do recipiente ou associado a este, indica que a composição é usada para tratar a condição de escolha. O artigo de fabricação pode ainda compreender um segundo recipiente que compreende um tampão farmacologicamente aceitável, como tampão fosfato salino, solução de Ringer e solução de dextrose. Este pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e embalagens inseridas com as instruções para o uso.

TERAPIA GÊNICA BASEADA NO ANTICORPO

Em outro aspecto da invenção, os ácidos nucléicos que compreendem as sequências que codificam anticorpos ou derivados funcionais destes, são administrados para tratar, inibir ou prevenir uma doença ou disfunção associada com a expressão e/ou atividade do Notch3, na forma de terapia gênica. A terapia gênica se refere à terapia realizada pela administração de um ácido nucléico expresso ou que possa ser expresso em um sujeito. Nesta realização da invenção, os ácidos nucléicos produzem sua proteína codificada que media um efeito terapêutico. Qualquer um dos métodos disponíveis para a terapia gênica podem ser usados de acordo com a presente invenção. Os métodos exemplares são descritas abaixo.

Para as revisões gerais dos métodos da terapia gênica, consulte Goldspiel, *et al.*, *Clinical Pharmacy* 12:488 (1993); Wu, *et al.*, *Biotherapy* 3:87 (1991); Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32:573 (1993); Mulligan, *Science* 260:926 (1993); Morgan, *et al.*, *Ann Rev Biochem* 62:191 (1993); May,

TIBTECH 11:155 (1993).

Em um aspecto, o composto compreende as sequências de ácido nucléico que codificam um anticorpo, as ditas sequências de ácido nucléico sendo parte dos vetores de expressão que expressam o anticorpo, fragmentos, proteínas quiméricas ou cadeias leves ou pesadas deste em um hospedeiro adequado. Em particular, tais sequências de ácido nucléico têm promotores ligados de maneira funcional ao anticorpo que codifica a região, o dito promotor sendo induzível ou constitutivo e, opcionalmente, específico para o tecido.

Em outra realização específica, as moléculas de ácido nucléico são usadas nos anticorpos que codificam as sequências e quaisquer outras sequências desejadas são ladeadas pelas regiões que promovem a recombinação homóloga em um sítio desejado no genoma, assim, promovendo a expressão intracromossomal os ácidos nucléicos que codificam o anticorpo (Koller, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8932 (1989); Zijlstra, *et al.*, *Nature* 342:435 (1989)). Em realizações específicas, a molécula de anticorpo expressa é um anticorpo de cadeia única; alternativamente, as sequências de ácido nucléico incluem as sequências que codificam as cadeias leve e pesada ou fragmentos destas do anticorpo.

A entrega dos ácidos nucléicos em um paciente pode ser tanto direta, no caso do paciente ser diretamente exposto ao ácido nucléico ou vetores que carregam o ácido nucléico, como indiretamente, no caso em que as células são primeiro transformadas com os ácidos nucléicos *in vitro*, e então transplantadas para o paciente. Essas duas abordagens são conhecidas, respectivamente, como terapia gênica *in vivo* ou *ex vivo*.

Em uma realização específica, as sequências de ácido nucléico são administradas diretamente *in vivo*, onde é expresso para produzir o produto codificado. Isso pode ser realizado por qualquer um dos numerosos métodos conhecidos na técnica, por exemplo, pela construção deles como parte de um

vetor de expressão de ácido nucléico adequado e pela administração de modo que eles se tornem intracelulares, por exemplo, por infecção usando retrovírus defeituosos ou atenuados ou outros vetores virais (consulte patente US 4.980.286), ou pela injeção direta do DNA nu ou pelo uso de bombardeamento de micropartículas (por exemplo, um gene gun; Biolistic, Dupont), ou revestimento com lipídeos ou receptores de superfície celular ou agentes transfectantes, encapsulação em lipossomos, micropartículas ou microcápsulas ou pela administração deles com ligação a um peptídeo, que é conhecido por entrar no núcleo, pela administração dele em uma ligação a um ligante submetido a endocitose mediada pelo receptor (consulte, Wu, *et al.*, *J Biol Chem* 262:4429 (1987)) (que pode ser usado para os tipos de célula alvo especificamente para expressão dos receptores) etc. Em outra realização, os complexos ligantes de ácido nucléico podem ser formados, no qual o ligante compreende um peptídeo viral fusogênico para interromper endossomas, permitindo que ácido nucléico evite a degradação lisossômica. Ainda em outra realização, o ácido nucléico pode ser direcionado *in vivo* para expressão e absorção celular específica, pelo direcionamento de um receptor específico (consulte, por exemplo, publicações PCT documentos WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188, WO 93/20221). Alternativamente, o ácido nucléico pode ser introduzido no meio intracelular e incorporado dentro do DNA da célula hospedeira para expressão, por recombinação homóloga (Koller, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8932 (1989); Zijlstra, *et al.*, *Nature* 342:435 (1989)).

Em uma realização específica, são usados vetores virais que contêm sequências de ácido nucléico que codificam um anticorpo da invenção. Por exemplo, pode ser usado um vetor retroviral (consulte, Miller, *et al.*, *Meth Enzymol* 217:581 (1993)). Esses vetores retrovirais contêm os componentes necessários para o empacotamento correto do genoma viral e integração no

DNA da célula hospedeira. As sequências de ácido nucléico que codificam o anticorpo que será usado na terapia gênica são clonados em um ou mais vetores, os quais facilitam a entrega do gene no paciente. Mais detalhes sobre os vetores retrovirais podem ser encontrados em Boesen, *et al.*, *Biotherapy* 6:291 (1994), que descreve o uso de um vetor retroviral para entregar o gene *mdrl* para células-tronco hematopoiéticas para tornar as mesmas mais resistentes à quimioterapia. Outras referências que ilustram o uso dos vetores retrovirais na terapia gênica são: Clowes, *et al.*, *J Clin Invest* 93:644 (1994); Kiem, *et al.*, *Blood* 83:1467 (1994); Salmons, *et al.*, *Human Gene Therapy* 4:129 (1993); e Grossman, *et al.*, *Curr Opin Gen e Dev* 3:110 (1993).

Os adenovírus também podem ser usados na presente invenção. Os adenovírus são especialmente veículos atrativos na invenção para a entrega dos anticorpos a um epitélio respiratório. Os adenovírus naturalmente infectam o epitélio respiratório. Outros alvos para os sistemas de entrega com base nos adenovírus são o fígado, o sistema nervoso central, células endoteliais e músculos. Os adenovírus têm a vantagem de ter a capacidade de infectar células não divisoras. Kozarsky, *et al.*, *Curr Opin Gen Dev* 3:499 (1993) apresenta uma revisão da terapia gênica com base nos adenovírus. Bout, *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3 (1994) demonstrou o uso dos vetores de adenovírus para transferir genes para o epitélio respiratório de macacos *rhesus*. Outros exemplos do uso de adenovírus na terapia gênica podem ser encontradas em Rosenfeld, *et al.*, *Science* 252:431 (1991); Rosenfeld, *et al.*, *Cell* 68:143 (1992); Mastrangeli, *et al.*, *J Clin Invest* 91:225 (1993); publicação PCT documento WO 94/12649; Wang, *et al.*, *Gene Therapy* 2:775 (1995). Vírus associado ao adeno (AAV) foi proposto para o uso na terapia gênica (Walsh, *et al.*, *Proc Soc Exp Biol Med* 204:289 (1993); patentes US 5.436.146, 6.632.670 e 6.642.051).

Outra abordagem para a terapia gênica envolve a transferência de

um gene para as células na cultura de tecido por métodos como eletroporação, lipofecção, transfecção mediada por fosfato de cálcio ou infecção viral. Usualmente, o método de transferência inclui a transferência de um marcador selecionável para as células. As células são então colocadas sob seleção para
5 isolar aquelas células que aceitam e expressam o gene transferido. Aquelas células são, então, entregues a um paciente.

Nesta realização, o ácido nucléico é introduzido em uma célula anterior para a administração *in vivo* da célula recombinante resultante. Tal introdução pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica,
10 incluindo, mas não se limitando a, transfecção, eletroporação, microinjeção, infecção com um vetor viral ou bacteriófago que contém as sequências de ácido nucléico, fusão celular, transferência gênica mediada por cromossomo, transferência gênica mediada por microcélula, fusão esferoplástica etc. Numerosas técnicas são conhecidas para a introdução de genes estranhos nas
15 células (consulte, por exemplo, Loeffler, *et al.*, *Meth Enzymol* 217:599 (1993); Cohen, *et al.*, *Meth Enzymol* 217:618 (1993); Cline, *Pharmac Ther* 29:69 (1985)) e podem ser usadas de acordo com a presente invenção, contanto que as funções de desenvolvimento e funções fisiológicas necessárias das células receptoras não sejam interrompidas. A técnica deve ser fornecida para a
20 transferência estável do ácido nucléico para a célula, para que o ácido nucléico seja expresso pela célula e preferencialmente de forma hereditária e expressa por sua progênie celular.

As células recombinantes resultantes podem ser entregues a um paciente por vários métodos conhecidos na técnica. As células sanguíneas
25 recombinantes (por exemplo, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras) são administradas preferencialmente por via intravenosa. A quantidade de células previstas para o uso depende do efeito desejado, do estado do paciente etc., e pode ser determinada por um técnico no assunto.

As células nas quais um ácido nucléico pode ser introduzido para os propósitos da terapia gênica englobam qualquer tipo celular desejado disponível, e inclui, mas não se limita a, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, células musculares, hepatócitos, células
 5 sanguíneas, como linfócitos T, linfócitos B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariócitos, granulócitos; várias células-tronco ou progenitoras, em especial células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras, por exemplo, aquelas obtidas da medula óssea, sangue do cordão umbilical, sangue periférico, fígado fetal etc.

Em uma realização, a célula utilizada para terapia gênica é autóloga para o paciente. As sequências de ácido nucléico que codificam um anticorpo da presente invenção são introduzidas nas células de forma que eles sejam expressos pelas células ou sua progênie e as células recombinantes são, então, administradas *in vivo* para efeito terapêutico. Em uma realização
 15 específica, são usadas células-tronco ou progenitoras. Quaisquer células-tronco e/ou progenitoras que podem ser isoladas e mantidas *in vitro* podem ser usadas potencialmente de acordo com essa realização da presente invenção (consulte, por exemplo, publicação PCT documento WO 94/08598; Stemple, *et al.*, *Cell* 71:973 (1992); Rheinwald, *Meth Cell Bio* 21A:229 (1980); Pittelkow, *et al.*, *Mayo Clinic Proc* 61:771 (1986)).

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 GERAÇÃO DE IMUNÓGENOS: DOMÍNIO EXTRACELULAR NOTCH3-

PROTEÍNA DE FUSÃO Fc

Os anticorpos monoclonais anti-Notch3 que se ligam
 25 especificamente ao LIN12/domínio de dimerização (deste ponto em diante "LD") de Notch3 humano foram gerados usando-se uma proteína de fusão Notch3-Fc recombinante como imunógeno, o qual compreende Notch3 LD fundido a uma região Fc gama 1 na extremidade terminal carboxila.

Especificamente, o imunógeno compreendia os resíduos de aminoácido de 1378 a 1640 do Notch3 LD (consulte figura 1) e a proteína de fusão γ 1Fc humana (Notch3 LD/Fc). Um anticorpo controle foi gerado compreendendo a região de repetição do EGF de Notch3 dos resíduos de aminoácido de 43 a 1377 (designado 255A-79).

A sequência da proteína Notch3 foi analisada usando-se um programa e serviço de pesquisa com base na internet (Motif Search, <http://motif.genome.jp/>). Os RNA hepáticos e pancreáticos humanos (Ambion, Inc. Austin, TX) foram utilizados como moldes para sintetizar a primeira fita de cDNA usando-se um kit para síntese de cDNA padrão comercialmente disponível. Os cDNA que codificam o Notch3 LD e a região de repetição do EGF foram amplificados por PCR na presença de Betaina (1-2M) e DMSO (5%). O fragmento de DNA Notch3-LD sintetizado por PCR (aproximadamente 0,8 kb) e o fragmento de DNA de repetição do EGF de Notch3 foram clonados em vetores de expressão compreendendo um His- γ 1Fc no vetor pSec ou no vetor pCD3.1 comercialmente disponível, cada um produzindo um marcador antibiótico diferente. Esta clonagem resultou em dois plasmídios de expressão, um expressando a proteína de fusão LD/Fc e o outro expressando uma proteína de fusão Notch3-EGF/Fc.

Para facilitar a construção do plasmídio e para aumentar a expressão de várias proteínas recombinantes Notch 3, foram gerados oligonucleotídeos que correspondem a uma sequência líder de peptídeos que compreendem as primeiras 135 pares de base da sequência codificadora de ácido nucléico do Notch3. Esses oligonucleotídeos continham algumas alterações nas posições codificadores *wobble* para diminuir o conteúdo de GC. Todas as alterações na sequência de nucleotídeo foram silenciadas, isto é, nenhuma alteração na sequência de aminoácido (figura 14A). Depois do anelamento dos oligonucleotídeos, o peptídeo líder modificado geneticamente,

o qual codifica a sequência, foi ligado ao restante da sequência codificadora por PCR-SOE (Ho, *et al.*, *Gene* 77:51 (1989); Horton, *et al.*, *BioTechniques* 8:528 (1990)) (consulte a figura 15). Esse peptídeo líder que codifica a sequência foi usado nos constructos de expressão do Notch3-LD/Fc e do Notch3. Portanto, ambas as proteínas de fusão Fc compreendem um peptídeo sinal ligado à porção N-terminal e a uma sequência γ 1Fc humana unida à porção C-terminal. A sequência de aminoácido do Notch3-LD, que inclui o peptídeo líder, é mostrada na figura 14 e SEQ ID NO:6.

A expressão das proteínas de fusão Notch3-EGF/Fc e Notch3-LD/Fc foi verificada pela transfecção transitória dos plasmídios de expressão do Notch3 em 293T (número ATCC CRL-11268, Manassas, VA) e células CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectivamente. Antes da transfecção, as células foram cultivadas em meio de crescimento DMEN (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo 10% de sêrico fetal bovino (FCS), 2 mM de glutamina e 1x da solução de aminoácidos essenciais seguida pela semeadura de cerca de 3 a 5 x10⁵ células por poço, em uma placa de 6 poços, e com crescimento por aproximadamente 24 horas. Três microgramas de cada plasmídio de expressão da proteína de fusão Notch3 foram transfectados em células de cada poço usando-se um sistema de transfecção Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguindo o protocolo do fabricante. Após a transfecção, as células foram cultivadas em meio de crescimento fresco e cultivadas em uma incubadora de CO₂ por aproximadamente 40 a 48 horas, antes de serem submetidas a análise da expressão da proteína de fusão Notch3. De forma alternativa, depois da transfecção, as células foram cultivadas em meio de crescimento durante 3 a 4 horas, então, foram transferidas para meio DMEM que continha FCS a 2% e cultivadas por aproximadamente 60 a 66 horas antes do meio condicionado projetado para a análise de proteínas secretadas.

As linhagens celulares estáveis foram geradas tanto por Notch3-LD/Fc (vetor) como Notch3-EGF/Fc (vetor His-Fcy/pSec). Cada plasmídio foi transfectado em células CHO. Depois da transfecção, as células foram cultivadas em médio de crescimento DMEM durante a noite, então, transferidas para meio de crescimento com 800 µg/ml de higromicina e cultivadas por, pelo menos, duas semanas até que as células não desenvolvessem a expressão de Notch3 pelo plasmídio fossem eliminadas pelos antibióticos. Os meios condicionados das linhagens celulares estáveis foram submetidos à análise *Western Blot*.

As células transfectadas, estáveis ou transitórias, foram testadas para a expressão e secreção da proteína de fusão Notch3-LD/Fc ou Notch3-EGF/Fc. As células transfectadas colhidas das placas de cultura foram lavadas uma vez com solução fosfato tamponada (PBS) e ressuspensas em água deionizada, misturadas com volume igual de tampão de carregamento para amostra de proteína a 2x (BioRad, Hercules, CA) e, então, aquecidas a aproximadamente 100°C durante 10 minutos. A proteína secretada foi analisada usando-se o médio condicionado misturado a um volume igual de tampão de carregamento de amostra de proteína a 2 x e aquecido, a proximadamente, 100°C durante 10 minutos. As amostras foram separadas usando-se SDS-PAGE em gradiente de 4 a 15%. As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana PVDF (BioRad, Hercules, CA), as quais foram bloqueadas em leite em pó desnatado (sem gordura) a 5% em PBTS (PBS com TWEEN-20® a 0,05%), por pelo menos uma hora antes da proteína ser transferida.

As proteínas de fusão Notch3-EGF/Fc e Notch3-LD/Fc foram detectadas pela incubação com anticorpo conjugado com HRP, específico para yFc (Sigma, St Louis, MO) em tampão de bloqueio durante uma hora em temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes em PBST e revelada

com um substrato quimioluminescente.

Para a purificação da proteína de fusão Notch3 domínio/FC, as linhagens celulares estáveis de CHO, conforme descrito acima, foram cultivadas em DMEM com FCS a 2% por até 5 dias. Um litro de médio condicionado foi coletado e submetido à cromatografia de coluna com microesferas de proteína A para ligação por afinidade. A coluna foi lavada com PBS e as proteínas ligadas foram diluídas em tampão citrato a 50 mM (pH 2,8) e o pH foi levado a neutro pela adição de tampão Tris-HCl a 1 M (pH 8). A pureza da proteína foi avaliada pela análise de proteína em gel usando-se um SDS-PAGE em gradiente de 4 a 15%. A concentração da proteína foi avaliada usando-se reagente *Coomassie blue* seguindo o protocolo do fabricante (Pierce, Rockford, IL). Até o fim deste procedimento, as quantidades em miligrama da proteína Notch3-LD/Fc e Notch3-EGF/Fc foram purificadas pelos testes de imunização e ligação por ELISA.

EXEMPLO 2: GERAÇÃO DE MABS ANTI-NOTCH3

Camundongos machos A/J (Harlan, Houston, TX), de 8 a 12 semanas de vida, foram submetidos à injeção subcutânea com 25 µg de Notch3-EGF/Fc ou Notch3-LD/Fc em adjuvante de Freund completo (Difco Laboratories, Detroit, MI) em 200 µl de PBS. Duas semanas depois das injeções e três dias antes do sacrifício, os camundongos foram injetados mais uma vez por via intraperitoneal com 25 µg do mesmo antígeno em PBS. Para cada fusão, as suspensões de célula únicas foram preparadas do baço de um camundongo imunizado e usadas para fusão com células de mieloma Sp2/0; 5x10⁸ de Sp2/0 e 5x10⁸ de células do baço foram fundidas em um meio que continha polietileno glicol a 50% (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, NY) e dimetilsulfoxida a 5%. As células foram, então, ajustadas a uma concentração de 1,5x10⁵ de células do baço por 200 µl da suspensão em médio Iscove (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100

unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,1 µM de hipozantina, 0,4 µM de aminopterina e 16 µM de timidina. Duzentos microlitros da suspensão de células foram adicionados em cada poço em cerca de sessenta placas de 96 poços. Depois de cerca de dez dias, os sobrenadantes da cultura foram retirados para seleção da sua atividade de ligação de anticorpo usando-se ELISA.

As placas de microteste Immulon II de fundo plano com 96 poços (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) foram revestidas com 100 µl de Notch3-EGF/Fc ou Notch3-LD/Fc (0,1 µg/ml) em (PBS) que continha 1 x de vermelho de Fenol e 3 a 4 gotas de pHix/litro (Pierce, Rockford, IL) e incubada durante a noite em temperatura ambiente. Depois da solução de revestimento ser removida por movimento rápido da placa, 200 µl de tampão de bloqueio contendo BSA a 2% em PBST contendo mertiolate a 0,1% foi adicionado a cada poço por uma hora para bloquear a ligação não específica. Os poços foram, então, lavados com PBST. Cinquenta microlitros de sobrenadante da cultura de cada poço de fusão foram coletados e misturados com 50 µl de tampão de bloqueio e, então, adicionados a poços individuais das placas de microtítulo. Depois de uma hora de incubação, os poços foram lavados com PBST. Os anticorpos murino de ligação foram, então, detectados pela reação com peroxidase de rábano silvestre conjugado com HRP, IgG de cabra anti-camundongo específico para Fc. A solução do substrato HRP contendo 0,1% de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina e 0,0003% de peróxido de hidrogênio foi adicionada aos poços para a revelação da cor durante 30 minutos. A reação foi concluída pela adição de 50 µl de H₂SO₄ a 2 M/poço. A OD em 450 nm foi lida com um leitor de placa de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Entre 185 hibridomas isolados e analisados, dois clones de hibridoma dos camundongos imunizados com Notch3-LD/Fc gerados de anticorpos antagonistas de Notch3, os quais foram ainda caracterizados.

O ELISA usando o sobrenadante dos dois clones de hibridoma produziu MAb 256A-4 e 256A-8, que mostraram forte atividade de ligação à proteína de fusão Notch3 LD/Fc purificada a qual foi gerada e não ligada ao Notch1-LD/Fc humano (LIN/domínio de dimerização fundido com a região Fc na extremidade carboxila) ou uma proteína de controle Fc humana (dados não apresentados) (tabela 1). Estudos posteriores usando os testes funcionais também demonstraram que os MAb 256A-4 e 256A-8 antagonizam especificamente o Notch3 com relação ao Notch1 e Notch2 (dados não apresentados).

TABELA 1.

LEITURAS OD DE ELISA DE MABS ANTI-NOTCH3 USANDO-SE SOBRENADANTE DE

HIBRIDOMA

	Notch3-LD/Fc		Notch1-LD/Fc	
	Média	S.D.	Média	S.D.
256A-4	4,000	0,000	0,106	0,004
256A-8	4,000	0,000	0,115	0,014
IgG1* controle	0,064	0,006	0,066	0,006
* IgG controle era um anticorpo monoclonal IgG1 irrelevante.				

Os clones de hibridoma positivo desta seleção primária de ELISA foram isolados por uma repicagem única de colônia e um segundo teste ELISA, conforme descrito acima, foi realizado para verificar a ligação específica aos imunógenos escolhidos. Os clones de hibridomas confirmados foram expandidos em culturas de maior escala. Os anticorpos monoclonais (MAbs) foram purificados a partir do meio destas culturas em maior escala usando-se uma coluna de afinidade de proteína A. O MAb anti-Notch3 foram, então, caracterizados usando-se os testes de ligação baseados em célula, análise de microscopia, *Western blot* e FACS.

EXEMPLO 3: TESTES DE LIGAÇÃO BASEADOS EM CÉLULA PARA MABS ANTI-NOTCH3

Os testes de ligação baseados em célula usados para caracterizar os MAbS anti-Notch3 necessitaram de clonagem de uma fase de leitura aberta do Notch3 humano inteiro em um vetor, neste caso pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA). A região de codificação do Notch3 foi sintetizada por RT-PCR usando-se um RNA de tumor hepático humano (Ambion, Inc., Austin, TX) como um molde. O constructo de plasmídeo final, Notch3/Hygro, expressou uma proteína Notch3 inteira, conforme descrito na figura 1. Uma linhagem celular estável que expressa Notch3 foi gerada por transfecção do constructo do plasmídeo Notch3/Hygro em células 293T (IATCC nº CRL-11268) usando kit de Lipofectamina 2000 seguindo o mesmo procedimento descrito no Exemplo 1. Após a transfecção, as células foram cultivadas em meio de crescimento DMEM durante a noite, então, repicados em meio de crescimento com 200 µg/ml de higromicina e cultivadas durante 12 a 14 dias. As colônias únicas isoladas por poço foram repicadas e crescidas em poços separados até que as células clone fossem amplificadas. Os clones 293T estáveis que eram resistentes à seleção de higromicina e altos níveis expressos da proteína Notch3 foram identificados por análise *Western blot* e por microscopia de fluorescência usando-se os anticorpos anti-Notch3 policlonais (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Uma expressão parcial do plasmídeo de Notch3 que continha apenas o domínio Notch LIN12/dimerização (LD) e o domínio transmembrana (TM) foi também construído por PCR e a subclonagem em pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Esse constructo do plasmídeo também contém um marcador V5 em sua porção C terminal e foi denominado Notch3-LDTM/V5. Uma linhagem celular estável que expressa esse plasmídeo, Notch3-LDTM/V5, foi gerada de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 1.

A linhagem celular Sup-T1 humana (ATCC nº. CRL-1942) que

expressa naturalmente o Notch3 também foi confirmada por *Western blot*. As células Sup-T1 foram cultivadas em meio RPMI1640 que continha soro fetal bovino a 10%, 2 mM de glutamina e 1 x de solução essencial de aminoácidos.

A ligação do anticorpo baseada em células foi avaliada usando-se FMAT™ (varredura macroconfocal fluorescente de alto rendimento) 8100 HTS System (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. As linhagens celulares que expressam naturalmente Notch3 ou transfectadas de maneira estável com constructos de expressão do Notch3 foram repicadas em placas de 96 poços. De forma alternativa, o as células 293T ou CHO transfectados temporariamente foram repicados em placa de 96 poços. As células foram repicadas em uma densidade de 30.000 a 50.000 células por poço. Depois de 20 a 24 horas, os MAbs anti-Notch3 e 1x do tampão de reação PBS foram adicionados aos poços e incubados por uma hora a 37°C. O anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com Cy-5 foi adicionado nos poços após remoção dos anticorpos primários.

A ligação do anticorpo baseado em célula também foi avaliado por classificador celular ativado por fluorescência (FACS) usando-se uma linhagem celular estável 293T/Notch3 gerada internamente e duas linhagens de câncer, linhagens celulares Sup-T1 humana e A2780 (UK ECACC No. Cat. No. 93112519), as quais expressam naturalmente Notch3 (dados não apresentados). As células foram incubadas primeiro com MAbs anti-Notch3 em 1x PBS. Depois de três lavagens, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à molécula fluorescente. As células foram resuspensas, fixadas em 1 x PBS com paraformaldeído a 0,1% e analisadas por FACS (BD Sciences, Palo Alto, CA). Os resultados indicaram que MAbs se ligam ao receptor Notch3 expresso com constructos de plasmídio recombinante ou como uma proteína original em células cultivadas (tabela 2). Entretanto, o Western blot mostrou que quando o receptor Notch3 ou a proteína de fusão Notch3-

LD/Fc são desnaturadas em SDS-PAGE e transferidas em membrana de *nylon* para *blot*, os MAb anti-Notch3 não se ligam mais, o que sugere um epitopo conformacional. As células 293T transfectados temporariamente que continham um plasmídio Notch3/Hygro também foram coradas para imunofluorescência conforme descrito acima e observadas por microscópio de fluorescência.

TABELA 2.

ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DE MABS ANTI-NOTCH3 EM ANÁLISE FACS BASEADA EM CÉLULA MOSTRADO COMO INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÉDIA

Anticorpo Monoclonal	Linhagem celular estável 293T/Notch3	Sup-T1
256A-4	195	43
256A-8	189	45
Controle negativo*	21	23
Controle positivo**	198	74

As análises de FMAT e FACS baseadas em célula confirmaram que os MAb 256A-4 e 256A-8 se ligaram de fato ao receptor Notch3 expresso dos constructos dos plasmídios recombinantes ou como proteína nativa em células cultivadas (tabela 2 e tabela 3).

TABELA 3

RESUMO DA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DOS MABS ANTI-NOTCH3 EM FMAT BASEADO EM CÉLULA

	mAb 256A-4	mAb 256A-8	mAb G3
Notch3 (inteiro)/ 293T	+	+	-

G3 é um Mab IgG1 humano usado como controle negativo. Um sinal de ligação positivo foi determinado com base no sinal FMAT lido, que era significativamente mais alto que o G3 e outros clones de hibridoma negativos ($p > 0,01$). O sinal negativo de leitura de ligação FMAT do G3 foi considerado

como fundo. As células 293T transfectadas temporariamente que continham um plasmídio Notch3/Hygro também foram coradas para imunofluorescência conforme descrito acima e observado por microscopia de fluorescência.

EXEMPLO 4: ANÁLISE WESTERN BLOT DA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DO MAB ANTI-

NOTCH3

O *Western blot* foi realizado para avaliar a atividade de ligação dos MABs anti-Notch3 em Notch3 sob condições desnaturantes, bem como os níveis de expressão do Notch3 e de outras proteínas relacionadas ao Notch em linhagens celulares humanas. A proteína de fusão Notch3-LD/Fc purificada foi combinada com tampão de carregamento de proteína. As amostras da proteína também foram preparadas a partir das células transfectadas temporariamente ou estáveis descritas no Exemplo 1, que foi colhida das placas de cultura, lavadas uma vez com PBS, resuspensas em tampão para extrair proteína celular (Pierce, Rockford, IL), e aquecidas a 100°C durante 10 minutos depois da adição de volume igual de tampão de carregamento de amostra de proteína a 2x. Todas as amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE em um gradiente de 4 a 15%. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de PVDF e os MABs anti-Notch3 foram aplicados à membrana de *Western blot* como um anticorpo de detecção primário. Um anticorpo secundário conjugado ao HRP foi usado para detecção e o sinal foi gerado usando-se um substrato quimioluminescente como descrito acima. Os anticorpos de controle positivo contra Fc humano, marcador V5, Notch3 e Notch1 foram adquiridos da Invitrogen, R&D Systems, Santa Cruz Biotechnologies, and Orbigen.

A análise de *Western blot* mostrou que os MABs 256A-4 e 256A-8 não se ligaram ao Notch3-LD/Fc sob condições desnaturantes, que está em contraste distinto com os resultados observados em análises de ELISA e FACS, nas quais o Notch3 LIN12/domínios de heterodimerização são mantidos

na conformação molecular nativa. Portanto, conclui-se que os MAb's 256A-4 e 256A-8 se ligam a epítopos múltiplos em Notch3-LD que devem ser mantidos em sua conformação nativa. Essa conclusão foi confirmada pelos resultados do mapeamento do epítopo discutido no Exemplo 8 abaixo.

EXEMPLO 5: AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DOS MAB'S ANTI-NOTCH3 POR TESTE

DE LUCIFERASE REPÓRTER

A. CONSTRUCTOS DO PLASMÍDIO

O constructo de expressão do Notch3 inteiro, descrito no Exemplo 3 acima, foi confirmado pelo sequenciamento e é idêntico à sequência publicada na figura 1. O plasmídeo Jagged1 humano foi obtido da OriGene (Rockville, MD) e verificado por sequenciamento como idêntico ao NM_000214 (número de acesso no NCBI/GenBank). Como o plasmídeo Jagged1 OriGene não teve um marcador de seleção de antibiótico, o fragmento Not I que continha a sequência codificadora Jagged1 foi transferido em pcDNA3.1/Higromicina. Um subclone de 3,7 Kb de cDNA Jagged2 humano foi gerado pela síntese da primeira fita de cDNA a partir da linhagem celular de leucemia de células T, HH (ATCC nº. CRL-2105) e amplificado por PCR. O cDNA Jagged2 foi subclonado posteriormente. A expressão do Notch3, Jagged1 e Jagged2 foi verificada por transfecção temporária e por *Western blot* conforme descrito no Exemplo 4.

Para gerar um plasmídeo luciferase repórter para a sinalização do Notch, dois *primers* de oligonucleotídeo complementares que continham repetições tandem do tipo de ligação CBF1 foram sintetizados e apresentaram as seguintes sequências:

5'GCTCGAGCTCGTGGGAAAATACCGTGGGAAAATGAACCGTGGGAAAATC
TCGTGG (SEQ ID NO 7)

5'GCTCGAGATTTTCCCACGAGATTTTCCCACGGTTC (SEQ ID NO 8)

Esses dois *oligoprimers* foram anelados a 65°C em 100 mM de

NaCl com cada oligo em uma concentração de 4 mM. Depois do anelamento simultâneo, os iniciadores foram estendidos por PCR. O produto de PCR foi clonado em um vetor disponível comercialmente. O inserto foi verificado por sequenciamento, que contém quatro repetições tandem de motivo de ligação CBF1 e dois sítios Xho I adjacentes. O inserto foi cortado usando Xho I e ligado a jusante da sequência codificadora do repórter luciferase de vagalume. Depois do teste da luciferase repórter e da análise de sequenciamento, os clones do plasmídio com oito repetições dos motivos de ligação CBF1 foram selecionados e designados CBF1-Luc.

B. GERAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR ESTÁVEL

Duas linhagens celulares estáveis foram geradas para testes funcionais usando-se linhagens celulares renais embrionárias (HEK293). Uma linhagem celular continha o plasmídio que expressa Notch3 e plasmídio repórter CBF1-Luc integrado no genoma nuclear. Essa linhagem celular foi gerada pela cotransfecção de plasmídeos Notch3/higromicina e CBF1-Luc em células 293T usando o LipoFectamine 2000 de acordo com o protocolo do fabricante. Os clones de célula de transfecção estável foram selecionados contra 200 µg/ml de higromicina em meio de crescimento DMEM e triados por teste de luciferase repórter e *Western blot*. Uma linhagem celular com alto nível relativo de expressão de Notch3 (com base no *Western blot*) e da atividade da luciferase foi selecionada para uso em teste funcional e o NC85 designado.

A segunda linhagem celular estável que continha um constructo de expressão do ligante do Notch, como Jagged1, Jagged2 ou pcDNA3.1 como controle negativo. As linhagens celulares estáveis que expressam Jagged1 ou pcDNA3.1 foram gerados pela transfecção em células 293T e seleção contra higromicina conforme descrito acima. O Jagged2 foi subclonado, transfectados em uma linhagem celular 293T e esperou-se integrar em um *locus* específico

no genoma. As células resistentes à higromicina foram selecionadas como acima.

C. TESTE DE LUCIFERASE REPÓRTER SOB CONDIÇÕES DE CO-CULTURA

As células NC85 foram misturadas e co-cultivadas com outra linhagem celular 293T que expressa de maneira estável o Jagged1 (Jagged1/293T) humano, Jagged2/293F ou pcDNA3.1/293T, respectivamente, durante 24 ou 48 horas. No fim da co-cultura, o meio foi removido por aspiração, as células foram lisadas em 1 x Tampão de Lise Passiva (E1501, Promega, Madison, WI) e atividades de luciferase foram testados usando o Sistema de Teste com Luciferase seguindo o protocolo do fabricante (E1501, Promega, Madison, WI) em luminômetro TD-20/20 (Turner Designs Instrument, Sunnyvale, CA). Conforme ilustrado na figura 6 e figura 7, quando as células NC85 foram co-cultivadas com Jagged1/293T ou com Jagged2/293F, a atividade da luciferase foi aumentada de 2 a 4 vezes em comparação àquelas da co-cultura com as células pcDNA3.1/293T. Para avaliar o efeito inibitório dos MAbs anti-Notch3, os anticorpos foram adicionados para a cultura da célula no começo da semeadura e à mistura das células co-cultivadas. (256-A, 256A-8 e um Controle de Domínio de Repetição EGF 255A-79).

D. TESTE DE LUCIFERASE REPÓRTER POR CÉLULAS CULTIVADAS NAS PLACAS

REVESTIDAS COM LIGANTE NOTCH

As placas regulares de cultura de tecido com 96 poços da Becton Dickinson Labware (#18779, Palo Alto, CA) foram revestidas com Jagged1/Fc de rato, DLL-4 humano (R&D Systems, Minneapolis, MN) ou Fc Humano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), albumina de soro bovino (Sigma, St Louis, MO). Cem microlitros de cada proteína (3µg/ml em PBS) foram distribuídos em um poço e mantidos em temperatura ambiente ou 4°C por, pelo menos, 8 horas até que a solução de revestimento fosse removida antes do

uso. As células de NC85 ou as células cancerígenas foram semeadas em 3 a 5 x 10⁴ células por poço e permitidas crescer por durante 28 a 48 horas. O teste de luciferase repórter e teste de inibição de anticorpo foram realizados conforme descritos na Seção C acima. O teste da luciferase repórter demonstrou que os dois MAb 256A-4 e 256A-8 ligados a LIN12/domínio de dimerização quase que completamente bloquearam a atividade de luciferase repórter induzida por Jagged1 e Jagged2 (figuras 6 e 7). Por outro lado, uma MAb especificamente ligado ao domínio Notch3-EGF (255A-79), como um controle, apenas inibiu a atividade da luciferase repórter induzida por Jagged1 (cerca 60% de inibição, figura 6), mas não a atividade da luciferase repórter induzida por Jagged2 (figura 7). A capacidade de MAb 256A-4 e 256A-8 para bloquear a atividade da luciferase repórter induzida por DLL-4 é mostrada na figura 8.

Os testes funcionais adicionais demonstraram que MAb 256A-4 e 256A-8 inibiram o aumento da regulação induzido por ligante dos genes alvo Notch. As células 293T que expressam o Notch3 recombinante foram cultivadas em placas revestidas com Jagged-1. Na presença de MAb 256A-4 e 256A-8, o aumento da regulação do HES5 e HEY2, dois genes alvo Notch, foi inibido, conforme medido por RT-PCR quantitativo (dados não apresentados).

Para verificar se os MAb anti-Notch3 poderiam se ligar ao Notch3 nativo expresso nas células de câncer humano e bloquear a sinalização do receptor, um teste de repórter foi realizado usando-se duas linhagens celulares de câncer ovariano, OV/CAR3 e A2780. Tanto 256A-4 como 256A-8 bloquearam significativamente a sinalização Notch induzida por Jagged1 mediada por Notch3 nativo em células OV/CAR3 (figura 9a). De maneira semelhante, ambos MAb inibiram cerca de 50% da atividade da luciferase induzida por Dll4 revestida na placa (figura 9b). O último resultado está de

acordo com o fato de que o Notch1 e o Notch3 são expressos em células A2780. Esses resultados sugerem que os MAbs anti-Notch3 podem inibir a sinalização mediada por Notch3 em células cancerosas.

EXEMPLO 6: TESTE DE APOPTOSE

A anexina V é um marcador apoptótico inicial de superfície celular e a população de células apoptóticas pode ser marcada por anticorpo anti-Annexina V marcada com fluóforo e quantificada por análise FACS. As células NC85 foram semeadas em 5 a 6 x 10⁴ células por poço em placa de 96 poços revestidas com FC ou Jagged1/Fc conforme descrito acima e mantidas em meio DMEM livre de soro por 24 horas. As células apoptóticas foram coradas por anticorpo anti-Annexina V marcado com FITC (BD Biosciences, Palo Alto, CA) e analisadas por FACS. As células cultivadas em superfície revestida com Jagged1/Fc apresentam uma população significativamente menor de célula apoptótica em comparação àquelas cultivadas na placa revestida com Fc (figura 10). Para estudar o efeito funcional do anticorpo, anti-Notch3 MAbs foram adicionados na cultura celular no começo do estudo. Como mostrado em figura 10, anti-Notch3 MAbs 256A-4 e 256A-8 bloquearam em aproximadamente 50 a 65% o efeito de sobrevida da célula induzida por Jagged1.

EXEMPLO 7: TESTES DE MIGRAÇÃO CELULAR, TESTES DE INVASÃO E TESTES DE MORFOLOGIA

Os testes de migração e invasão celular *in vitro* são frequentemente usados para avaliar o potencial de metástase de células cancerosas. Esses testes foram realizados para avaliar o efeito inibitório exercido pelos MAbs anti-Notch3 na linhagem celular tumorigênica 293T/Notch3 estável (NC85). O teste de invasão foi realizado usando-se placa de inserção de 48 poços Costar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O inserto divide o poço em câmara superior e inferior que são separadas por

uma membrana porosa (diâmetro do poro = 8 μ m) no fundo do inserto. Os ligantes Notch, Jagged1/Fc, DLL-4 ou Fc humano foram imobilizados sobre a superfície na membrana conforme descrito nas seções acima. As células NC85 foram semeadas em 100.000 células por poço e mantidas em DMEM livre de soro na câmara superior e com FCS/DMEM a 10% na câmara inferior. Depois de 10 a 24 horas, as células que permaneceram na superfície superior da membrana inserida foram removidas e as células que passaram pela membrana aderente no fundo da membrana de inserto foram coradas por velvet cristal a 0,05% em PBS. O corante foi extraído das células por ácido acético a 30% e leituras de absorção a 590 nm foram registrados. Os MAbs anti-Notch3 foram adicionados à cultura celular 24 horas antes da semeadura das células NC85 na placa de teste Costar e todos os MAbs foram adicionados à cultura celular 24 horas antes de semear células NC85 na placa de teste Costar. Os MAbs frescos foram adicionados para manter a mesma concentração na placa de teste de migração. Os resultados desse experimento são mostrados na figura 11A.

O teste de invasão foi realizado usando-se a placa de matrigel de 48 poços Becton Dickinson (BD Labware, Palo Alto, CA). O poço de cultura celular foi dividido por um inserto no poço em câmara superior e inferior que são separadas por uma membrana porosa (diâmetro do poro = 8 μ m) no fundo do poço do inserto. Uma densidade otimizada de matrigel foi revestida na superfície superior da membrana e fibronectina foi revestida sobre a superfície inferior da membrana pelo fabricante. As células NC85, Jagged1/293T e pcDNA3.1/293T foram misturadas em pares conforme indicado na figura 11B. Um total de 6 a 10 x 10⁴ células foram sedimentadas em cada poço na placa de matrigel de 48 poços e cultivadas em meio de crescimento durante 24 horas. As células que permaneceram na superfície superior da membrana inserida foram removidas e as células

que passaram pela membrana aderente no fundo da membrana de inserto foram corados por velvet cristal a 0,05% em PBS. O corante foi extraído e as medidas de absorção foram realizadas conforme descrito na seção anterior. Os MAb's foram adicionados no começo da cultura celular misturada. Os resultados são mostrados na figura 11B.

O teste de migração celular mostrou que quando as células NC85 foram cultivadas em membrana revestida com Jagged1, a sinalização de Notch3 aumentou significativamente a migração celular, e MAb's 256A-4 e 256A-8 claramente inibiram a migração (figura 11A). O experimento de invasão mostrou uma tendência semelhante (figura 11B).

Adicionalmente, o efeito dos MAB's 256A-4 e 256A-8 sobre a formação de "esferas" de células induzido por Jagged foi examinado. Quando as células 293T que superexpressam Notch3 foram cultivadas em placas revestidas com Jagged-1, as células se formaram livremente associadas a "bolas de célula" ou "esferas". Na presença dos MAB's 256A-4 e 256A-8, entretanto, a formação destas esferas de célula foi inibida (dados não mostrados).

EXEMPLO 8: MAPEAMENTO DO EPITOPO DE LIGAÇÃO DE MAB'S ANTI-NOTCH3

A. ESTRATÉGIA E LÓGICA DE TROCA DE DOMÍNIO

Primeiro, os Mabs Notch3 antagonista se ligam ao Notch3 LIN12/domínio de dimerização (LD), mas não ao homólogo humano Notch1 LIN12/domínio de dimerização (Consulte as figuras 12 e 13). Segundo, os MAB's anti-Notch3 não se ligam à proteína Notch3 desnaturada em *Western blot* conforme discutido no Exemplo 4, indicando que os MAB's se ligam ao epitopos conformacionais. Terceiro, Notch3 e Notch1 compartilham aproximadamente 55% de homologia de sequência de aminoácido no LIN12/domínio de dimerização e, portanto, conclui-se que uma troca de domínio entre Notch3 e Notch1, nesta região não romperia a conformação da

proteína.

B. GERAÇÃO DE CONSTRUCTOS DE PROTEÍNA DE FUSÃO COM TROCA DE DOMÍNIO

A análise da sequência indicou que o Notch3 apresenta três repetições LIN12 e seu domínio de dimerização está dividido em dois segmentos. Portanto, cinco constructos de proteína com troca de domínio foram gerados com cada uma das três repetições LIN12 e dois segmentos de dimerização substituídos pelos domínios correspondentes do Notch1. Os constructos com troca de domínio foram gerados usando-se PCR-SOE (Ho, *et al.*, *Gene* 77:51 (1989); Horton, *et al.*, *BioTechniques* 8:528 (1990)) conforme ilustrado na figura 12. As reações de PCR e PCR-SOE foram realizadas usando-se PCR com 1M de Betaína e 5% de DMSO adicionado à reação. A termociclagem do PCR foi quase a mesma para o PCR e PCR-SOE, exceto que a etapa de anelamento de cada ciclo de PCR foi estendida por um minuto no PCR-SOE. O produto final do PCR-SOE foi subclonado e verificado por sequenciamento. O clone do plasmídio com a sequência correta do inserto foi clivado com Nhe I e Xho I para cortar o inserto, que foi purificado em gel e subclonado. Os cinco constructos Notch3/Notch1 com troca de domínio são ilustrados na figura 12. Para facilitar o mapeamento do epitopo, o peptídeo de sinalização da cadeia kappa IgG humana foi usada como peptídeo líder nos constructos com troca de domínio. As sequências de aminoácidos são mostradas nas figuras 16 e 17.

O cDNA do Notch1-LD foi amplificado por PCR usando-se PCR e os métodos descritos na seção acima. O molde da primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total da célula PA-1 (ATCC nº. CRL-1572). A sequência que codifica o peptídeo líder da cadeia kappa IgG humana foi amplificada por PCR, usada como peptídeo líder para se ligar à extremidade 5' do Notch1-LD por PCR-SOE e subclonada em His- γ 1Fc/pSec.

Com base nos resultados da análise de ELISA, os domínios alvo

LI, D1 e D2 foram divididos em outros subdomínios. A análise da ligação de ELISA usando-se os constructos de expressão do subdomínio mostraram que apenas L1 e D2 foram requeridos para a ligação Notch3 MAb. O domínio D1 não foi necessário. Portanto, os domínios L1 e D2 foram divididos em grupamentos de mutações de aminoácidos para outras análises do sítio de ligação específico. Os constructos que continham L1 e troca de subdomínio D2 ou grupamentos de mutações de aminoácido, conforme mostrado na figura 16 e figura 17 foram gerados.

C. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO COM TROCA DE DOMÍNIO NOTCH3/NOTCH1

Os plasmídios com troca de domínio Notch3/Notch1-LD foram temporariamente transfectados em células CHO usando-se LipoFectamina 2000. As células CHO foram semeadas em meio de crescimento DMEM com FCS a 10% em 0,8 a aproximadamente 1×10^6 células por poço em placa de 6 poços, mantida em incubadora com CO₂ durante a noite, antes da transfecção. As células foram recuperadas depois da transfecção no meio de crescimento por cerca de 3 horas, então transferidas para DMEM com FCS a 2% e cultivadas durante três dias. Os meios condicionados foram colhidos e centrifugados em 3500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante contendo a proteína com troca de domínio Notch3-LD secretada a partir de CHO foi coletado e preparado para *Westeen Blot* e análise de ligação por ELISA. O ELISA mostrou que todas as proteínas de fusão com troca de domínio foram expressas e secretadas em meio condicionado (tabela 4), que foi confirmada por análise *Western blot* (dados não mostrados).

As leituras de ELISA usadas no anticorpo Fc anti-humano como anticorpo de detecção mostrou que todas as proteínas foram expressas em meio condicionado. O IgG/Fc humano foi usado como controle. O ponto de iniciação de IgG/Fc humano revestido em cada poço é 100 ng.

TABELA 4
LEITURAS DE ELISA

Estatística: média								
Diluição	N1-LD	N3-LD	troca de L1	troca de L2	troca de L3	troca de D1	troca de D2	hlgG-Fc
1	3,2000	3,3445	3,4380	3,0970	3,2910	3,2870	3,4110	3,5510
0,250000	3,1305	2,7625	2,9890	2,7390	2,9050	3,0225	2,9570	3,4995
0,062500	2,3785	1,3870	2,8145	1,2835	2,6855	2,2575	2,3240	3,5805
0,015625	1,0085	0,3960	1,5245	0,3865	1,7350	0,9110	0,8800	3,2355
0,003906	0,3300	0,1075	0,4755	0,1220	0,5970	0,3450	0,2130	1,8585
0,000977	0,2095	0,0400	0,1640	0,1105	0,1780	0,1635	0,0615	0,5865
0,000244	0,1340	0,0225	0,0500	0,0595	0,0575	0,1045	0,0275	0,1445
6,104E-05	0,1000	0,0135	0,0405	0,0505	0,0230	0,0575	0,0305	0,0315
1,526E-05	0,0975	0,0165	0,0205	0,0430	0,0180	0,0400	0,0155	0,0220
3,815E-06	0,0580	0,0140	0,0135	0,0300	0,0150	0,0425	0,0235	0,0230
9,537E-07	0,0540	0,0125	0,0155	0,0245	0,0215	0,0480	0,0145	0,0165
2,384E-07	0,0415	0,0125	0,0145	0,0305	0,0155	0,0370	0,0150	0,0190
Estatística: S.D.								
Diluição	N1-LD	N3-LD	troca de L1	troca de L2	troca de L3	troca de D1	troca de D2	hlgG-Fc
1	0,0778	0,0290	0,0679	0,0255	0,0933	0,1018	0,0283	0,0071
0,250000	0,0191	0,0304	0,0354	0,0396	0,0693	0,1619	0,1202	0,0148
0,062500	0,0898	0,0919	0,0007	0,1096	0,0318	0,0021	0,0071	0,0290
0,015625	0,0474	0,0354	0,0106	0,0417	0,1075	0,0071	0,0325	0,1450
0,003906	0,0523	0,0177	0,0460	0,0113	0,0453	0,0339	0,0057	0,0573
0,000977	0,0092	0,0057	0,0042	0,0191	0,0156	0,0205	0,0007	0,0955
0,000244	0,0226	0,0092	0,0014	0,0106	0,0064	0,0035	0,0049	0,0276

Estatística: média								
Diluição	N1-LD	N3-LD	troca de L1	troca de L2	troca de L3	troca de D1	troca de D2	hlgG-Fc
6,104E-05	0,0113	0,0007	0,0064	0,0035	0,0057	0,0134	0,0064	0,0064
1,526E-05	0,0021	0,0035	0,0049	0,0042	0,0000	0,0028	0,0007	0,0028
3,815E-06	0,0113	0,0028	0,0021	0,0000	0,0042	0,0064	0,0007	0,0057
9,537E-07	0,0014	0,0007	0,0007	0,0007	0,0064	0,0057	0,0021	0,0078
2,384E-07	0,0120	0,0035	0,0049	0,0021	0,0007	0,0113	0,0014	0,0127

As abreviações para proteínas usadas nos testes de ligação de ELISA da Tabela 4 incluem: N1-LD, Notch1-LD/Fc. N3-LD, Notch3-LD/Fc. troca de L1: 1ª troca de domínio LIN12. troca de L2: 2ª troca de domínio LIN12. troca de L3: 3ª troca de domínio de LIN12. troca de D1: 1ª troca de domínio de dimerização. troca de D2: 2ª troca de domínio de dimerização. hlgG-Fc, Fc IgG humano.

D. ANÁLISE DE LIGAÇÃO DO EPITOPO USANDO-SE ELISA

As placas de microteste Immulon II de fundo plano com 96 poços (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) foram revestidas com anticorpo Fc anti-humano (Jackson ImmunoResearch) pela adição de 100 µl do anticorpo em solução salina tamponada (PBS) que continha 1 x de vermelho de Fenol e de 3 a 4 gotas de pHix/litro (Pierce, Rockford, IL) e incubadas durante a noite em temperatura ambiente. Depois da solução de revestimento ser removida por movimento rápido da placa, 200 µl de tampão de bloqueio contendo BSA a 2% em PBST contendo mertiolate de 0,1% foram adicionados a cada poço por uma hora para bloquear ligação não específica. Os poços foram, então, lavados com PBST. Cinco microlitros do meio condicionado acima de cada transfecção do constructo com troca de domínio Notch3/Notch1 foram coletados, misturados com 50 µl de tampão de bloqueio e adicionados a poços individuais das placas de microtítulo. Depois de uma hora de incubação, a proteína com

troca de domínio Notch3/Notch1-LD foi capturada pelo anticorpo de revestimento anti-Fc e os poços foram lavados com PBST. Os MAb's Anti-Notch3 e os MAb's controle combinados com isotipo foram diluídos em série em tampão de bloqueio como acima e 50 µl dos MAb's diluídos foram adicionados em cada poço para avaliar a ligação à proteína com troca de domínio Notch3/Notch1. Peroxidase de rábano silvestre conjugada a (HRP), IgG de cabra anti-camundongo específico para Fc foram usados para detecção. A solução do substrato HRP contendo 0,1% de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina e 0,0003% de peróxido de hidrogênio foi adicionada aos poços para a revelação da cor durante 30 minutos. A reação foi concluída pela adição de 50 µl de 2 M H₂SO₄/poço. A OD em 450 nm foi lida com leitor de ELISA. Os constructos com troca de subdomínio e os grupamentos das mutações foram examinados de maneira similar por análise ELISA acima.

Os experimentos de ligação de ELISA usando-se MAb's 256A-4 e 256A-8 contra as proteínas com troca de domínio mostraram que a troca do 1º domínio LIN12 (L1) e do 2º domínio de dimerização (D2) eliminaram completamente todas as três ligações de MAb's, enquanto a troca do 1º domínio de dimerização (D1) eliminaram a ligação dos MAb's 256A-4 e 256A-8 (figura 13 B e C). A troca do 3º domínio LIN12 (L3) enfraqueceu significativamente a ligação. No entanto, ambos os MAb's ainda eram capazes de se ligar à proteína de fusão. A troca do 2º domínio LIN12 não apresentou interferência na ligação dos MAb's (figuras 13B e C). Um anticorpo de controle positivo, que foi previamente mapeado para se ligar ao 1º domínio LIN12, se ligou a todas as proteínas de fusão com troca de domínio, exceto a L1 (figura 13D). Por outro lado, o anticorpo de controle negativo do isótopo, G3, não se liga a qualquer uma das proteínas de fusão de troca de domínio no teste ELISA (dados não mostrados). Foi concluído a partir de ambos os experimentos que o 1º domínio LIN12 e o 2º domínio de dimerização foram necessários para a

ligação dos MAb 256A-4 e 256A-8.

Para outros mapas dos epitopo no 1º domínio LIN12 (L1) para o qual os MAb anti-Notch3 se ligam, o domínio L1 foi dividido mais uma vez em três subdomínios, L1-sub1, L1-sub2 e L1-sub3 e trocado com as sequências correspondentes no Notch1 (figura 16). Um teste de ligação ELISA mostrou que a troca L1-sub1 não apresentou efeitos inibitórios sobre a atividade de ligação, e as trocas L1-sub2 e L1-sub3 eliminaram a ligação (figura 16). Nas regiões L1-sub2 e L1-sub3, há cinco grupamentos de resíduos de aminoácidos que diferem entre Notch3 e Notch1. Portanto, os constructos da proteína de fusão com troca foram gerados dentro destes cinco grupamentos de aminoácidos (figura 16). A análise de ELISA demonstrou que a troca L1-grupamento 4 não apresentou inibição em todas as três ligações de MAb. Os quatro grupamentos de troca remanescentes eliminaram parcialmente ou completamente a ligação de MAb anti-Notch. Assim, aqueles quatro grupamentos dos resíduos de aminoácidos representou quatro epitopos diferentes aos quais os MAb se ligaram. L1-cluster3 (aminoácido: DRE) e L1-cluster5 (aminoácido: SVG) são necessários. L1-cluster1 (aminoácidos: AKR) e cluster2 (aminoácidos: DQR) também desempenharam uma função na ligação do MAb anti-Notch3, essas mutações enfraqueceram significativamente as mutações das ligações de MAb.

Para mapear os epítomos no 2º domínio de dimerização (D2) do Notch3 para o qual os MAb anti-Notch3 se ligam, o domínio D2 foi dividido mais uma vez em três subdomínios, D2-sub1, D2-sub2 e D2-sub3, D2-sub4 e D2-sub5. As sequências destes subdomínios foram trocados com as sequências correspondentes no Notch1 (figura 17). Um teste de ligação ELISA mostrou que os MAb 256A-4 e 256A-8 apresentaram forte ligação às trocas D1-sub2 e ao D2-sub3, mas não à troca D2-sub1 e D2-sub4. Ambos os MAb mostraram ligação fraca ao D2-sub5 (figura 17). Portanto, os dados

sugeriram que o D2-sub1 e D2-sub4 são necessários para a ligação MAb anti-Notch3 e o D2-sub5 pode ajudar a atividade da ligação.

Os MAbs 256A-4 e 256A-8 são anticorpos antagonistas que se ligam ao epítipo conformacional que compreende L1 e D2, enquanto outro anticorpo 256A-13 que se liga apenas ao L1 é agonista (consulte pedido co-
pendente de patente US 11/874.682, depositada em 18 de outubro de 2007). Além disso, o 256A-13 agonista compete com o 256A-4 antagonista para um epítipo no L1 e os estudos de mapeamento do epítipo sugerem que eles se ligam a um epítipo de sobreposição em L1. A principal diferença é que os anticorpos antagonistas também se ligam ao D2, enquanto o anticorpo agonista não se liga. Para testar a hipótese de que a ligação simultânea a L1 e D2 é responsável pela atividade antagonista, foi analisado um anticorpo 256A-2, que se liga a um epítipo semelhante em D2 como 256A-4. O MAb 256A-2 não é antagonista nem agonista (dados não apresentados). Os estudos mostraram que 256A-2 não compete com 256A-13 e pode se ligar ao Notch3 simultaneamente. Além disso, 256A-2 e 256A-13 individualmente, podem parcialmente competir com 256A-4, entretanto, em combinação, estes dois anticorpos bloquearam completamente a ligação de 256A-4 a Notch3 (dados não mostrados). Os estudos também mostraram que a ligação separada de dois anticorpos aos epítipos no L1 e D2 não levam à inibição da ativação do Notch3 dependente do ligante, o que sugere que os anticorpos antagonistas formam uma ponte, possivelmente travando e estabilizando a interação de L1 e D2, e prevenindo as trocas conformacionais induzidas por ligante. (Consulte figura 18).

EXEMPLO 9: SEQUENCIAMENTO DOS MABS ANTI-NOTCH3

Devido às propriedades de ligação do anticorpo serem dependentes das regiões variáveis das cadeias leve e pesada, as sequências variáveis de 256A-4 e 256A-8 foram subclassificadas e sequenciadas. O

subtipo IgG do anticorpo foi determinado usando-se um kit de Anticorpo Monoclonal de Camundongo Isostrip (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Os resultados mostraram que ambos os MAbs, 256A-4 e 256A-8 apresentam uma cadeia pesada IgG1 e uma cadeia leve kappa.

5 As sequências da região variável da cadeia pesada e da cadeia leve foram decodificados completamente por clonagem em RT-PCR e cDNA. Os RNAs totais dos clones de hibridoma 256A-4 e 256A-8 foram isolados usando-se um kit Mini RNeasy seguindo o protocolo do fabricante (QIAGEN, Valencia, CA). A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando-se
10 o molde de RNA e o kit Superscriptase III. A região variável da cadeia leve e da cadeia pesada dos cDNAs foram amplificadas por PCR a partir da primeira fita do cDNA usando-se *primers forward* degenerativos na extremidade 5' da região de codificação da cadeia kappa e um *primer* reverso compatível com a região constante na junção da extremidade 3' da
15 região variável, ou usando-se *primers forward* degenerativos que abrange a extremidade 5' da região codificadora de cadeia pesada de camundongo e um *primer* reverso da região constante da cadeia pesada de camundongo. O produto de PCR foi clonado em um vetor comercialmente disponível e sequenciado por Lone Star Lab (Houston, TX). As sequências
20 de nucleotídeo foram analisadas utilizando-se o programa de computador DNASTar (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Cada sequência do MAb anti-Notch3 foi determinada pelas sequências de múltiplos clones de PCR derivados do mesmo clone de hibridoma.

O MAb 256A-4 contém 123 e 116 resíduos de aminoácidos,
25 respectivamente, na sua região variável da cadeia pesada e da cadeia leve (figuras 4A e 4B). O MAb 256A-8 consiste em 122 e 123 resíduos de aminoácidos na sua região variável da cadeia pesada e da cadeia leve, respectivamente (figuras 5A e 5B).

EXEMPLO 10: IMPACTO DOS ANTICORPOS ANTAGONISTAS NOTCH3 SOBRE A**CLIVAGEM DE METALOPROTEASE DO NOTCH3**

A ativação do receptor Notch envolve a clivagem de metaloprotease induzida por ligante no sítio justaposto à membrana (S2) o que gera uma subunidade extracelular. Essa clivagem é um pré-requisito essencial para clivar S3 para liberar a região intracelular ativada por Notch. Descobriu-se que 256A-4 e 256A-8 necessitam da presença de, pelo menos, uma porção dos domínios Notch3 L1 e D2 para suas ligações. Esses dois domínios não estão localizados muito próximos na sequência linear, mas estão em dois polipeptídeos separados, sugerindo que esses anticorpos podem estabilizar uma configuração de Notch autoinibida, inativa. Para testar se os anticorpos antagonistas podem inibir os eventos de ativação, incluindo duas clivagens proteolíticas, células 293T que expressam de maneira estável um receptor Notch3 recombinante (células NC85) são tratadas com Jagged-1 recombinante imobilizado ou co-cultivados com as células 293T que expressam Jagged-1. As subunidades extracelulares solúveis, geradas por clivagem proteolítica no meio de cultura, são detectadas pelo teste ELISA usando-se um anticorpo ligado a uma superfície sólida que reconhece o produto de clivagem do Notch3. Espera-se que os MAbs antagonistas do Notch3 diminuam a geração das subunidades extracelulares de Notch3 no meio condicionado, enquanto que os anticorpos que se ligam ao Notch3 funcional não o façam.

Para detectar diretamente o fragmento de clivagem S2, são realizados eletroforese com SDS PAGE a 7,5% e *Western blot* com Notch3 na extremidade C terminal do anticorpo. O fragmento S2 é menor, com 57 resíduos de aminoácidos e migra ligeiramente um pouco mais rápido que a subunidade pequena do Notch3 não clivada (subunidade transmembrana).

Para examinar se os MAbs antagonistas Notch3 inibem a clivagem por metaloprotease induzida por ligante do Notch3 em S2, as células 293T que

expressam o Notch3 recombinante foram tratados com o composto E inibidor de γ secretase (1 μ M) durante 4 horas, que estabilizam o produto da clivagem no sítio S2, o que permite o acúmulo. Na presença dos MAbS 256A-4 e 256A-8, a clivagem da metaloprotease induzida por Jagged 1 do Notch3 em S2 foi inibida (dados não apresentados).

EXEMPLO 11: ESTUDO DE EFICÁCIA USANDO-SE MODELOS DE CÂNCER HUMANO EM CAMUNDONGOS COM XENOENXERTO

A. CÉLULAS CANCEROSAS E CÉLULAS TUMORGÊNICAS HUMANAS

As linhagens celulares cancerosas humanas que expressam Notch3 como HCC2429, HCC95 podem ser obtidas junto ao Academic Institutes ou ATCC. Os 293T/pcDNA3.1 e 293T/Notch3 (NC85) são gerados pela transfecção de 293T com os genes relacionados e seleção com higromicina, conforme descrito nas seções anteriores. Todas as células são cultivadas em meio DMEM ou RPMI 1640 com soro fetal bovino a 10%, piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais, L-glutamina, solução de vitamina e penicilina-estreptomicina (Flow Laboratories, Rockville, MD). As linhagens celulares são incubadas em uma mistura de CO₂ a 5% e 95% de ar a 37°C em uma incubadora. As culturas são mantidas por não mais que 3 semanas após a recuperação dos estoques congelados. As suspensões de células únicas em crescimento logarítmico com $\geq 90\%$ de viabilidade são usadas para injeção de células tumorais depois da lavagem com PBS.

B. ANIMAIS

Os camundongos são obtidos a partir, por exemplo, da Área de Produção Animal do Instituto Nacional de Câncer Institute na Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick, MD. Os animais são criados para fins experimentais e não foram tratados anteriormente no início do estudo. Os camundongos selecionados para uso nos estudos são escolhidos de maneira uniforme em relação à idade e ao peso, conforme possível. Eles têm

de 6 a 8 semanas de idade e seus pesos corporais iniciais variam de aproximadamente 18 a 25 gramas. Os registros das datas de nascimento para os animais usados neste estudo são retidos nos dados brutos do estudo e a variação de peso no momento da alocação do grupo é especificada no relatório. Cada animal é identificado por etiqueta auricular numerada. Os animais são alocados por grupo de tratamento (4 camundongos/gaiola) em gaiolas de caixa de sapato de poliuretano descartável que continha uma camada de celulose, de acordo ou excluindo as diretrizes NIH. Durante o curso do estudo, as condições ambientais na sala dos animais são monitoradas e mantidas dentro de uma variação de temperatura de 18 a 26 °C e a umidade relativa é registrada diariamente. Um ciclo de iluminação de claro/escuro de 12 horas é mantida por todo o estudo. Os animais receberam alimento irradiado. Nenhum contaminante foi encontrado no alimento em níveis que interfeririam nos resultados deste estudo. A água autoclavada está disponível para cada animal através de garrafas de água. Nenhum contaminante foi encontrado na água em níveis que interfeririam nos resultados deste estudo. Antes da alocação no estudo, todos os animais do estudo são aclimatados para seu ambiente designado por pelo menos 7 dias antes do primeiro dia da dosagem.

C. MODELOS TUMORAIS E ESTUDOS DE EFICÁCIA

Os camundongos são anestesiados usando pentobarbital de sódio (50 mg/kg de peso corporal) e colocados na posição de decúbito lateral. As células cancerosas, como linhagens celulares de câncer de pulmão não-pequenas (NSCLC), HCC2429 (Haruki, *et al. Cancer Res.* 65:3555 (2005)), HCC95 (From Dr. John Mina) e H2122 (ATCC no. CRL5985) em 50 µl de Hanks que continha 10% de matrigel são injetados no lobo esquerdo dos pulmões. Depois da injeção da célula tumoral, os camundongos são virados para a posição de decúbito lateral esquerdo e observados durante 45 a 60 min até que eles se restabeleçam completamente. Os registros das injeções de

células tumorais são mantidos nos dados brutos do estudo.

Todos os animais são observados dentro de suas gaiolas pelo menos uma vez por dia durante o estudo e os achados clínicos nos dados brutos do estudo. Os animais que apresentam efeitos pronunciados prejudiciais podem ser removidos do estudo e isso é considerado quando necessário. O peso corporal é medido uma vez a cada semana durante o tratamento. Os tecidos cancerosos de cada camundongo, quando disponíveis, são colhidos e armazenados para a caracterização biológica potencial futura.

EXEMPLO 12: TESTE PARA DOENÇAS RELACIONADAS AO NOTCH3

Para identificar outras doenças relacionadas ao Notch3, pode-se sequenciar o gene Notch3 das amostras do paciente, realizar FISH (fluorescência de hibridização in situ) e CGH (hibridização genômica comparativa) para verificar a translocação e a amplificação gênica usando-se as células do paciente ou realizar imunohistoquímica para verificar a superexpressão do receptor Notch3 usando-se o tecido do paciente ou cortes tumorais. Além disso, pode-se isolar e cultivar células de um paciente suspeito em apresentar uma doença associada com Notch3 e estudar o impacto de um anticorpo antagonista da presente invenção na migração, invasão, sobrevida e proliferação celular. Os protocolos para a migração celular e teste de invasão celular são descritas no Exemplo 7 e o protocolo para um teste de apoptose está descrito no Exemplo 6. Para o teste de proliferação celular, as células cultivadas das amostras do paciente foram semeadas em placa de 96 poços com e sem ligantes Notch. Os anticorpos antagonistas são adicionados no início da cultura. O número de células é contado em momentos específicos usando-se corante azul tripan. As análises de FISH e CGH de Notch3 podem ser realizadas usando-se os protocolos publicados por Park, *et al.* (*Cancer Res*, 66: 12 (2006)).

Os especialistas na técnica reconhecerão, ou serão capazes de

averiguar usando não mais que a experimentação de rotina, muitas equivalentes às realizações específicas da invenção descritas no presente pedido. Tais equivalentes são destinadas a serem englobados pelas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESDADA ("VH"), que compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade de sequência àquela apresentada na SEQ ID NO: 2.

5 2. REGIÃO DA CADEIA VH, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente uma região constante.

3. REGIÃO DA CADEIA VH, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de compreender os domínios CH1, CH2 e CH3 da região constante.

10 4. REGIÃO DA CADEIA VH, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato da região constante ser de um anticorpo IgG.

5. REGIÃO DA CADEIA VH, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato do anticorpo IgG ser um anticorpo IgG1, um anticorpo IgG2, um anticorpo IgG3 ou um anticorpo IgG4.

15 6. REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESDADA ("VH"), que compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade de sequência àquela apresentada na SEQ ID NO: 4.

7. REGIÃO DA CADEIA VH, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente uma região constante.

20 8. REGIÃO DA CADEIA VH, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de compreender os domínios CH1, CH2 e CH3 da região constante.

9. REGIÃO DA CADEIA VH, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato da região constante ser de um anticorpo IgG.

25 10. REGIÃO DA CADEIA VH, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato do anticorpo IgG ser um anticorpo IgG1, um anticorpo IgG2, um anticorpo IgG3 ou um anticorpo IgG4.

11. SEQUÊNCIA DA CADEIA VH, que compreende SEQ ID

NOs: 32, 33 e 34.

12. SEQUÊNCIA DA CADEIA VH, que compreende SEQ ID NOs: 38, 39 e 40.

13. ÁCIDO NUCLÉICO, que codifica uma ou mais das SEQ ID NOs: 2, 4, 32 a 34 e 38 a 40.

14. VETOR, que compreende um ou mais ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 19.

15. CÉLULA, que compreende o vetor, de acordo com a reivindicação 20.

16. ANTICORPO, que compreende a região da cadeia VH, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 8, caracterizado pelo fato do anticorpo se ligar especificamente ao Notch3.

17. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente uma região da cadeia VL que compreende (a) uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade àquela apresentada na SEQ ID NO: 3, ou (b) uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade àquela apresentada na SEQ ID NO: 5.

18. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato da região da cadeia VL compreender a SEQ ID NO: 3 e a região da cadeia VH compreender a SEQ ID NO: 2.

19. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato da região da cadeia VL compreender a SEQ ID NO: 5 e a região da cadeia VH compreender a SEQ ID NO: 4.

20. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 e 24 a 26, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente uma região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada.

21. ANTICORPO, que compreende a sequência da cadeia VH, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato do anticorpo se ligar especificamente ao Notch3.

22. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente uma sequência da cadeia VL que compreende a SEQ ID NOs: 35, 36 e 37.

23. ANTICORPO, que compreende a sequência da cadeia VH, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato do anticorpo se ligar especificamente ao Notch3.

24. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente uma sequência da cadeia VL que compreende a SEQ ID NOs: 41, 42 e 43.

25. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 31, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente uma região constante da cadeia leve e/ou uma região constante da cadeia pesada.

26. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22, 24 a 26 e 28 a 31, caracterizado pelo fato do anticorpo ser uma cadeia Fv única.

27. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 e 24 a 32, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente um marcador.

28. ANTICORPO, que se liga a um epítipo conformacional Notch 3, que compreende o domínio LIN12 que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO. 9 e o domínio 2 de dimerização que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO. 18.

29. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato do domínio LIN12 consistir na SEQ ID NO. 9.

30. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato do domínio de dimerização consistir na SEQ ID NO. 18.

31. ANTICORPO, que se liga a um epítipo conformacional Notch 3, que compreende os resíduos de aminoácidos 1395-1396, 1402-1404 e 1420-1422 do domínio L1 LIN12 de Notch3 (SEQ ID NO:1) e os resíduos de aminoácidos 1576-1578 e 1626-1628 do domínio de dimerização D2 de Notch3 (SEQ ID NO:1).

32. USO DO ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 34, para detectar uma doença relacionada ao Notch3.

33. MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato do cultivo ser sob condições apropriadas para a produção de um anticorpo e isolamento do anticorpo produzido.

34. ANTICORPO ANTI-NOTCH3, que se liga especificamente ao Notch3 humano, em que inibi a sinalização do anticorpo Notch3.

35. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22, 24 a 32, 34 a 38 e 46, caracterizado pelo fato do anticorpo ser um fragmento de anticorpo.

36. FORMA HUMANIZADA DO ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22, 24 a 38 e 46 a 47.

37. USO DE UM ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22, 24 a 38 e 46 a 48, na preparação de um medicamento.

38. USO DE UM ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22, 24 a 38 e 46 a 48, para o tratamento de uma doença ou disfunção relacionada ao Notch3.

39. USO, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato da doença ser leucemia linfoblástica aguda de células T, linfoma, doença do fígado envolvendo vascularização anormal, diabetes, câncer ovariano,

doenças envolvendo morte celular vascular, artrite reumatóide, câncer pancreático, câncer de pulmão de células não-pequenas, neoplasmas de plasmócitos (como mieloma múltiplo, leucemia de plasmócitos e plasmocitoma extramedular) e neuroblastoma.

LISTAGEM DE SEQUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.
 Kang LI
 Bin-Bing Stephen ZHOU
 Yucheng LI
 Sek Chung FUNG
 Sanjaya SINGH

<120> ANTICORPOS ANTI-NOTCH3 ANTAGONISTAS E USO DESTES NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS AO NOTCH3

<150> US 60/875597
 <151> 18-12-2006

<150> US 60/879218
 <151> 06-01-2007

<130> P4059R1 WO

<160> 43

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
 <211> 2321
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 1

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

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

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

Cys Ala Asn Gly Gly Arg Cys Thr Gln Leu Pro Ser Arg Glu Ala Ala
 50 55 60

Cys Leu Cys Pro Pro Gly Trp Val Gly Glu Arg Cys Gln Leu Glu Asp
 65 70 75 80

Pro Cys His Ser Gly Pro Cys Ala Gly Arg Gly Val Cys Gln Ser Ser
 85 90 95

Val Val Ala Gly Thr Ala Arg Phe Ser Cys Arg Cys Pro Arg Gly Phe
 100 105 110

Arg Gly Pro Asp Cys Ser Leu Pro Asp Pro Cys Leu Ser Ser Pro Cys
 115 120 125

Ala	His	Gly	Ala	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Arg	Phe	Leu	Cys	
	130					135					140					
Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	Gly	Arg	Ser	Cys	Arg	Ser	Asp	Val	Asp	
145					150					155					160	
Glu	Cys	Arg	Val	Gly	Glu	Pro	Cys	Arg	His	Gly	Gly	Thr	Cys	Leu	Asn	
				165					170					175		
Thr	Pro	Gly	Ser	Phe	Arg	Cys	Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	
			180					185					190			
Leu	Cys	Glu	Asn	Pro	Ala	Val	Pro	Cys	Ala	Pro	Ser	Pro	Cys	Arg	Asn	
		195					200					205				
Gly	Gly	Thr	Cys	Arg	Gln	Ser	Gly	Asp	Leu	Thr	Tyr	Asp	Cys	Ala	Cys	
	210					215					220					
Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Gly	Gln	Asn	Cys	Glu	Val	Asn	Val	Asp	Asp	Cys	
225					230					235					240	
Pro	Gly	His	Arg	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Val	Asp	Gly	Val	Asn	
				245					250					255		
Thr	Tyr	Asn	Cys	Gln	Cys	Pro	Pro	Glu	Trp	Thr	Gly	Gln	Phe	Cys	Thr	
			260					265					270			
Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Gln	Leu	Gln	Pro	Asn	Ala	Cys	His	Asn	Gly	
	275						280					285				
Gly	Thr	Cys	Phe	Asn	Thr	Leu	Gly	Gly	His	Ser	Cys	Val	Cys	Val	Asn	
	290					295					300					
Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Gln	Asn	Ile	Asp	Asp	Cys	Ala	Thr	
305					310					315					320	
Ala	Val	Cys	Phe	His	Gly	Ala	Thr	Cys	His	Asp	Arg	Val	Ala	Ser	Phe	
				325					330					335		
Tyr	Cys	Ala	Cys	Pro	Met	Gly	Lys	Thr	Gly	Leu	Leu	Cys	His	Leu	Asp	
			340					345					350			
Asp	Ala	Cys	Val	Ser	Asn	Pro	Cys	His	Glu	Asp	Ala	Ile	Cys	Asp	Thr	
		355					360					365				
Asn	Pro	Val	Asn	Gly	Arg	Ala	Ile	Cys	Thr	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Thr	
	370					375					380					
Gly	Gly	Ala	Cys	Asp	Gln	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Ser	Ile	Gly	Ala	Asn	
385					390					395					400	
Pro	Cys	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Cys	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Ser	Phe	Leu	
				405					410					415		
Cys	Gln	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Thr	Asp	Val	
			420					425					430			

Asn	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Asn	Gln	Ala	Thr	Cys	Leu	Asp
		435					440					445			
Arg	Ile	Gly	Gln	Phe	Thr	Cys	Ile	Cys	Met	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Thr
	450					455					460				
Tyr	Cys	Glu	Val	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Ser	Ser	Pro	Cys	Val	Asn
465					470					475					480
Gly	Gly	Val	Cys	Lys	Asp	Arg	Val	Asn	Gly	Phe	Ser	Cys	Thr	Cys	Pro
				485					490					495	
Ser	Gly	Phe	Ser	Gly	Ser	Thr	Cys	Gln	Leu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Ala
			500					505					510		
Ser	Thr	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly	Ala	Lys	Cys	Val	Asp	Gln	Pro	Asp	Gly
		515					520					525			
Tyr	Glu	Cys	Arg	Cys	Ala	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Thr	Leu	Cys	Asp	Arg
	530					535					540				
Asn	Val	Asp	Asp	Cys	Ser	Pro	Asp	Pro	Cys	His	His	Gly	Arg	Cys	Val
545					550					555					560
Asp	Gly	Ile	Ala	Ser	Phe	Ser	Cys	Ala	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly
				565					570					575	
Thr	Arg	Cys	Glu	Ser	Gln	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Gln	Pro	Cys	Arg
			580					585					590		
His	Gly	Gly	Lys	Cys	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Cys	Arg	Cys
		595					600					605			
Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly	Val	Asn	Cys	Glu	Val	Asn	Ile	Asp	Asp	Cys
	610					615					620				
Ala	Ser	Asn	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Val	Cys	Arg	Asp	Gly	Ile	Asn	Arg
625					630					635					640
Tyr	Asp	Cys	Val	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Pro	Leu	Cys	Asn	Val
				645					650					655	
Glu	Ile	Asn	Glu	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gly	Glu	Gly	Gly	Ser	Cys
			660					665					670		
Val	Asp	Gly	Glu	Asn	Gly	Phe	Arg	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu
		675					680					685			
Pro	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Pro	Ser	His	Pro	Cys	Ala	His	Glu	Pro	Cys
	690					695					700				
Ser	His	Gly	Ile	Cys	Tyr	Asp	Ala	Pro	Gly	Gly	Phe	Arg	Cys	Val	Cys
705					710					715					720
Glu	Pro	Gly	Trp	Ser	Gly	Pro	Arg	Cys	Ser	Gln	Ser	Leu	Ala	Arg	Asp
				725					730					735	

Ala Cys Glu Ser Gln Pro Cys Arg Ala Gly Gly Thr Cys Ser Ser Asp
 740 745 750
 Gly Met Gly Phe His Cys Thr Cys Pro Pro Gly Val Gln Gly Arg Gln
 755 760 765
 Cys Glu Leu Leu Ser Pro Cys Thr Pro Asn Pro Cys Glu His Gly Gly
 770 775 780
 Arg Cys Glu Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Val Cys Ser Cys Pro Gln
 785 790 795 800
 Gly Trp Gln Gly Pro Arg Cys Gln Gln Asp Val Asp Glu Cys Ala Gly
 805 810 815
 Pro Ala Pro Cys Gly Pro His Gly Ile Cys Thr Asn Leu Ala Gly Ser
 820 825 830
 Phe Ser Cys Thr Cys His Gly Gly Tyr Thr Gly Pro Ser Cys Asp Gln
 835 840 845
 Asp Ile Asn Asp Cys Asp Pro Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys
 850 855 860
 Gln Asp Gly Val Gly Ser Phe Ser Cys Ser Cys Leu Pro Gly Phe Ala
 865 870 875 880
 Gly Pro Arg Cys Ala Arg Asp Val Asp Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys
 885 890 895
 Gly Pro Gly Thr Cys Thr Asp His Val Ala Ser Phe Thr Cys Thr Cys
 900 905 910
 Pro Pro Gly Tyr Gly Gly Phe His Cys Glu Gln Asp Leu Pro Asp Cys
 915 920 925
 Ser Pro Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Val Asn
 930 935 940
 Ser Phe Ser Cys Leu Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Ala His Cys Gln
 945 950 955 960
 His Glu Ala Asp Pro Cys Leu Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Val
 965 970 975
 Cys Ser Ala Ala His Pro Gly Phe Arg Cys Thr Cys Leu Glu Ser Phe
 980 985 990
 Thr Gly Pro Gln Cys Gln Thr Leu Val Asp Trp Cys Ser Arg Gln Pro
 995 1000 1005
 Cys Gln Asn Gly Gly Arg Cys Val Gln Thr Gly Ala Tyr Cys Leu
 1010 1015 1020
 Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Arg Leu Cys Asp Ile Arg Ser Leu
 1025 1030 1035

Pro Cys	Arg Glu Ala Ala Ala	Gln Ile Gly Val	Arg	Leu Glu Gln
1040		1045	1050	
Leu Cys	Gln Ala Gly Gly Gln	Cys Val Asp Glu	Asp	Ser Ser His
1055		1060	1065	
Tyr Cys	Val Cys Pro Glu Gly	Arg Thr Gly Ser	His	Cys Glu Gln
1070		1075	1080	
Glu Val	Asp Pro Cys Leu Ala	Gln Pro Cys Gln	His	Gly Gly Thr
1085		1090	1095	
Cys Arg	Gly Tyr Met Gly Gly	Tyr Met Cys Glu	Cys	Leu Pro Gly
1100		1105	1110	
Tyr Asn	Gly Asp Asn Cys Glu	Asp Asp Val Asp	Glu	Cys Ala Ser
1115		1120	1125	
Gln Pro	Cys Gln His Gly Gly	Ser Cys Ile Asp	Leu	Val Ala Arg
1130		1135	1140	
Tyr Leu	Cys Ser Cys Pro Pro	Gly Thr Leu Gly	Val	Leu Cys Glu
1145		1150	1155	
Ile Asn	Glu Asp Asp Cys Gly	Pro Gly Pro Pro	Leu	Asp Ser Gly
1160		1165	1170	
Pro Arg	Cys Leu His Asn Gly	Thr Cys Val Asp	Leu	Val Gly Gly
1175		1180	1185	
Phe Arg	Cys Thr Cys Pro Pro	Gly Tyr Thr Gly	Leu	Arg Cys Glu
1190		1195	1200	
Ala Asp	Ile Asn Glu Cys Arg	Ser Gly Ala Cys	His	Ala Ala His
1205		1210	1215	
Thr Arg	Asp Cys Leu Gln Asp	Pro Gly Gly Gly	Phe	Arg Cys Leu
1220		1225	1230	
Cys His	Ala Gly Phe Ser Gly	Pro Arg Cys Gln	Thr	Val Leu Ser
1235		1240	1245	
Pro Cys	Glu Ser Gln Pro Cys	Gln His Gly Gly	Gln	Cys Arg Pro
1250		1255	1260	
Ser Pro	Gly Pro Gly Gly Gly	Leu Thr Phe Thr	Cys	His Cys Ala
1265		1270	1275	
Gln Pro	Phe Trp Gly Pro Arg	Cys Glu Arg Val	Ala	Arg Ser Cys
1280		1285	1290	
Arg Glu	Leu Gln Cys Pro Val	Gly Val Pro Cys	Gln	Gln Thr Pro
1295		1300	1305	
Arg Gly	Pro Arg Cys Ala Cys	Pro Pro Gly Leu	Ser	Gly Pro Ser
1310		1315	1320	

Cys 1325	Arg	Ser	Phe	Pro	Gly	Ser 1330	Pro	Pro	Gly	Ala	Ser 1335	Asn	Ala	Ser
Cys 1340	Ala	Ala	Ala	Pro	Cys	Leu 1345	His	Gly	Gly	Ser	Cys 1350	Arg	Pro	Ala
Pro 1355	Leu	Ala	Pro	Phe	Phe	Arg 1360	Cys	Ala	Cys	Ala	Gln 1365	Gly	Trp	Thr
Gly 1370	Pro	Arg	Cys	Glu	Ala	Pro 1375	Ala	Ala	Ala	Pro	Glu 1380	Val	Ser	Glu
Glu 1385	Pro	Arg	Cys	Pro	Arg	Ala 1390	Ala	Cys	Gln	Ala	Lys 1395	Arg	Gly	Asp
Gln 1400	Arg	Cys	Asp	Arg	Glu	Cys 1405	Asn	Ser	Pro	Gly	Cys 1410	Gly	Trp	Asp
Gly 1415	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu	Ser 1420	Val	Gly	Asp	Pro	Trp 1425	Arg	Gln	Cys
Glu 1430	Ala	Leu	Gln	Cys	Trp	Arg 1435	Leu	Phe	Asn	Asn	Ser 1440	Arg	Cys	Asp
Pro 1445	Ala	Cys	Ser	Ser	Pro	Ala 1450	Cys	Leu	Tyr	Asp	Asn 1455	Phe	Asp	Cys
His 1460	Ala	Gly	Gly	Arg	Glu	Arg 1465	Thr	Cys	Asn	Pro	Val 1470	Tyr	Glu	Lys
Tyr 1475	Cys	Ala	Asp	His	Phe	Ala 1480	Asp	Gly	Arg	Cys	Asp 1485	Gln	Gly	Cys
Asn 1490	Thr	Glu	Glu	Cys	Gly	Trp 1495	Asp	Gly	Leu	Asp	Cys 1500	Ala	Ser	Glu
Val 1505	Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Arg 1510	Gly	Val	Leu	Val	Leu 1515	Thr	Val	Leu
Leu 1520	Pro	Pro	Glu	Glu	Leu	Leu 1525	Arg	Ser	Ser	Ala	Asp 1530	Phe	Leu	Gln
Arg 1535	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu	Arg 1540	Thr	Ser	Leu	Arg	Phe 1545	Arg	Leu	Asp
Ala 1550	His	Gly	Gln	Ala	Met	Val 1555	Phe	Pro	Tyr	His	Arg 1560	Pro	Ser	Pro
Gly 1565	Ser	Glu	Pro	Arg	Ala	Arg 1570	Arg	Glu	Leu	Ala	Pro 1575	Glu	Val	Ile
Gly 1580	Ser	Val	Val	Met	Leu	Glu 1585	Ile	Asp	Asn	Arg	Leu 1590	Cys	Leu	Gln
Ser 1595	Pro	Glu	Asn	Asp	His	Cys 1600	Phe	Pro	Asp	Ala	Gln 1605	Ser	Ala	Ala

Asp	Tyr	Leu	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Asp	Phe	Pro
1610						1615					1620			
Tyr	Pro	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	Pro	Pro	Glu
1625						1630					1635			
Pro	Ser	Val	Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Val	Leu
1640						1645					1650			
Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Leu	Gly	Val	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Lys
1655						1660					1665			
Arg	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Trp	Phe	Pro	Glu	Gly	Phe	Ser	Leu	His
1670						1675					1680			
Lys	Asp	Val	Ala	Ser	Gly	His	Lys	Gly	Arg	Arg	Glu	Pro	Val	Gly
1685						1690					1695			
Gln	Asp	Ala	Leu	Gly	Met	Lys	Asn	Met	Ala	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu
1700						1705					1710			
Met	Gly	Glu	Val	Ala	Thr	Asp	Trp	Met	Asp	Thr	Glu	Cys	Pro	Glu
1715						1720					1725			
Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Val	Glu	Glu	Pro	Gly	Met	Gly	Ala	Glu	Glu
1730						1735					1740			
Ala	Val	Asp	Cys	Arg	Gln	Trp	Thr	Gln	His	His	Leu	Val	Ala	Ala
1745						1750					1755			
Asp	Ile	Arg	Val	Ala	Pro	Ala	Met	Ala	Leu	Thr	Pro	Pro	Gln	Gly
1760						1765					1770			
Asp	Ala	Asp	Ala	Asp	Gly	Met	Asp	Val	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Asp
1775						1780					1785			
Gly	Phe	Thr	Pro	Leu	Met	Leu	Ala	Ser	Phe	Cys	Gly	Gly	Ala	Leu
1790						1795					1800			
Glu	Pro	Met	Pro	Thr	Glu	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Thr	Ser	Ala
1805						1810					1815			
Ser	Ile	Ile	Ser	Asp	Leu	Ile	Cys	Gln	Gly	Ala	Gln	Leu	Gly	Ala
1820						1825					1830			
Arg	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Glu	Thr	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Arg
1835						1840					1845			
Tyr	Ala	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Leu	Asp	Ala	Gly	Ala
1850						1855					1860			
Asp	Thr	Asn	Ala	Gln	Asp	His	Ser	Gly	Arg	Thr	Pro	Leu	His	Thr
1865						1870					1875			
Ala	Val	Thr	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly	Val	Phe	Gln	Ile	Leu	Ile	Arg
1880						1885					1890			

Asn	Arg	Ser	Thr	Asp	Leu	Asp	Ala	Arg	Met	Ala	Asp	Gly	Ser	Thr
1895						1900					1905			
Ala	Leu	Ile	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Glu	Gly	Met	Val	Glu
1910						1915					1920			
Glu	Leu	Ile	Ala	Ser	His	Ala	Asp	Val	Asn	Ala	Val	Asp	Glu	Leu
1925						1930					1935			
Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	His	Trp	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Asn	Val	Glu
1940						1945					1950			
Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Asn	Lys	Asp	Met	Gln
1955						1960					1965			
Asp	Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Ala	Ala	Arg	Glu	Gly
1970						1975					1980			
Ser	Tyr	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu	Leu	Asp	His	Phe	Ala	Asn	Arg
1985						1990					1995			
Glu	Ile	Thr	Asp	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Pro	Arg	Asp	Val	Ala	Gln
2000						2005					2010			
Glu	Arg	Leu	His	Gln	Asp	Ile	Val	Arg	Leu	Leu	Asp	Gln	Pro	Ser
2015						2020					2025			
Gly	Pro	Arg	Ser	Pro	Pro	Gly	Pro	His	Gly	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu
2030						2035					2040			
Cys	Pro	Pro	Gly	Ala	Phe	Leu	Pro	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Gln	Ser
2045						2050					2055			
Gly	Ser	Lys	Lys	Ser	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Gly	Leu	Gly
2060						2065					2070			
Pro	Gln	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Gly	Lys	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Cys
2075						2080					2085			
Pro	Gly	Pro	Leu	Ala	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Val	Asp
2090						2095					2100			
Ser	Leu	Asp	Ser	Pro	Arg	Pro	Phe	Gly	Gly	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro
2105						2110					2115			
Gly	Gly	Phe	Pro	Leu	Glu	Gly	Pro	Tyr	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr
2120						2125					2130			
Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Gly	Leu
2135						2140					2145			
Gly	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Gly	Cys	Val	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
2150						2155					2160			
Asn	Pro	Val	Ala	Val	Pro	Leu	Asp	Trp	Ala	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro
2165						2170					2175			

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Lys Arg Gln Val Leu Ala
2315 2320

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA DE MAB 256A-4

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 114
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA DE MAB 256 A-4

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA DE MAB 256 A-8

<400> 4

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

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

<210> 5
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE DE MAB 256 A-8

<400> 5

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

<210> 6

<211> 45
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> SEQUÊNCIA CONDUTORA DE NOTCH3 MODIFICADA

<400> 6

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

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

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

<210> 7
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> PRIMER DE OLIGONUCLEOTÍDEO

<400> 7
 gctcgagctc gtgggaaaat accgtgggaa aatgaaccgt gggaaaatct cgtgg 55

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> PRIMER DE OLIGONUCLEOTÍDEO

<400> 8
 gctcgagatt ttcccacgag attttcccac gggttc 35

<210> 9
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> TROCA DE DOMÍNIO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-SUB1)

<400> 9

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

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

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
35

<210> 10
<211> 39
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TROCA DE DOMÍNIO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-SUB2)

<400> 10

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

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

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
35

<210> 11
<211> 39
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TROCA DE DOMÍNIO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-SUB2)
<400> 11

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

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

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
35

<210> 12
<211> 39
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TROCA DE DOMÍNIO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-AA
SWAP 1)

<400> 12

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

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

Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn
35

<210> 13
<211> 39
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TROCA DE AMINOÁCIDO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-AA
SWAP 2)

<400> 13

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

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

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
35

<210> 14
<211> 39
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TROCA DE AMINOÁCIDO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-AA
SWAP 3)

<400> 14

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

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

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
35

<210> 15
<211> 39
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TROCA DE AMINOÁCIDO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-AA
SWAP 3)

<400> 15

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

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

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
 35

<210> 16
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> TROCA DE AMINOÁCIDO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-AA
 ---SWAP 4)

<400> 16

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

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

Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly
 35

<210> 17
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> TROCA DE AMINOÁCIDO LIN 12 DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG. 16 L1-AA
 SWAP 5)

<400> 17

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

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

Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn
 35

<210> 18
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3 (FIG 17 D2)

<400> 18

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
65

<210> 19
<211> 69
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TROCA DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG 17
D2-SUB1)

<400> 19

Glu Leu Ala Pro Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp
1 5 10 15

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
65

<210> 20
<211> 69
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TROCA DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG 17
D2-SUB2)

<400> 20

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

Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ala Ala Ser Ser Gln Cys Phe Pro Asp
20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
65

<210> 21

<211> 69

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> NOTCH TROCA DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/ NOTCH 1
(FIG 17 D2-SUB3)

<400> 21

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Gln Ser
20 25 30

Ala Thr Asp Ala Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
65

<210> 22

<211> 69

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> TROCA DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG 17
D2-SUB4)

<400> 22

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser
35 40 45

Leu Asn Ile Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
65

<210> 23

<211> 69

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> TROCA DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG 17 D2-SUB5)

<400> 23

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu
50 55 60

Pro Pro Ala Pro Ser
65

<210> 24

<211> 69

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> TROCA DE AMINOÁCIDO DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/ NOTCH 1 (FIG 17 D2-AA SWAP1)

<400> 24

Glu Leu Ala Pro Asp Val Arg Gly Ser Val Val Met Leu Glu Ile Asp
1 5 10 15

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
 50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
 65

<210> 25

<211> 69

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> TROCA DE AMINOÁCIDO DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/
 NOTCH 1 (FIG 17 D2-AA SWAP2)

<400> 25

Glu Leu Ala Pro Glu Val Ile Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp
 1 5 10 15

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
 20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
 35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
 50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
 65

<210> 26

<211> 69

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> NOTCH TROCA DE AMINOÁCIDO DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH
 3/ NOTCH 1 (FIG 17 D2-AA SWAP3)

<400> 26

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
 20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Glu Arg
 35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
 50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
65

<210> 27
<211> 69
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> NOTCH TROCA DE AMINOÁCIDO DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH
3/ NOTCH 1 (FIG 17 D2-AA SWAP4)

<400> 27

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Ser
35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
65

<210> 28
<211> 69
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> TROCA DE AMINOÁCIDO DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/
NOTCH 1 (FIG 17 D2-AA SWAP5)

<400> 28

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
35 40 45

Leu Asn Ile Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
65

<210> 29
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> TROCA DE AMINOÁCIDO DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/
 NOTCH 1 (FIG 17 D2-AA SWAP6)

<400> 29

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
 20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
 35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Lys Ile Glu Asp Val Arg Gly Glu Pro Leu Glu
 50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
 65

<210> 30
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> TROCA DE AMINOÁCIDO DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH 3/
 NOTCH 1 (FIG 17 D2-AA SWAP7)

<400> 30

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

Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe Pro Asp
 20 25 30

Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val Glu Arg
 35 40 45

Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Ala Val Gln Ser Glu Pro Leu Glu
 50 55 60

Pro Pro Glu Pro Ser
 65

<210> 31
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> NOTCH TROCA DE AMINOÁCIDO DE DOMÍNIO DE DIMERIZAÇÃO DE NOTCH
3/ NOTCH 1 (FIG 17 D2-AA SWAP8)

<400> 31

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

Asn	Arg	Leu	Cys	Leu	Gln	Ser	Pro	Glu	Asn	Asp	His	Cys	Phe	Pro	Asp
			20					25					30		

Ala	Gln	Ser	Ala	Ala	Asp	Tyr	Leu	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Arg
		35					40					45			

Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Pro	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Gly	Glu	Thr	Val	Glu
	50					55					60				

Pro	Pro	Ala	Pro	Ser
65				

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

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

<400> 32

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

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

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

<400> 33

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

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

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

<400> 34

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

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

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

<400> 35

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

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

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

<400> 36

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

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

<400> 37

Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

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

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDR-H2 DE MAB 256A-8

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDR-H3 DE MAB 256A-8

<400> 40

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

<210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDR-L1 DE MAB 256A-8

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDR-L2 DE MAB 256A-8

<400> 42

Tyr Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>

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

<400> 43

Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
1 5

Sequência de aminoácido de Notch 3 humano (NP_000426)

```

1  MCPCARQRRR RRRPMSPPPP PPPVRALPLL LLLACPGAAA PPCLDQSPCA NCGRCTQLPS
61  REAACLCPPG WVGERCQLED PCHSGPCAGR GVCQSSVVAG TARFSCRCPR GFRGPDCSLP
121 DPCLSSPCAH GARCSVGPDG RFLCSCPPGY QGRSCRSDDV ECRVGEPCRH GGTCLNTPGS
181 FRCQCPAGYT GPLCENPAVP CAPSPCRNGG TCRQSGDLTY DCACLPGFEG QNCEVNVDDC
241 PCHRCNLNGCT CVDCVNTYNC QCPPEWTCQF CTEDVDECQL QPNACHNGGT CFNTLGGHSC
301 VCVNGWTGES CSQNIDDCAT AVCFHGATCH DRVASFYCAC PMCKTGLLCH LDDACVSNPC
361 HEDAICDINP VNGRAICTCP PCFTGGACDQ DVDECSIGAN PCEHLGRGVN TQGSFLCQCG
421 RGYTCPRCET DVNECLSCPC RNQATCLDRI GQFTCIOMAG FTGTYCEVDI DECQSSPCVN
481 GGVCKDRVNG FSCTCPSCFS GSTCQLDVDE CASTPCRNGA KCVDPQPDGYE CRCAEGFEGT
541 LCDRNVDDCS PDPCHHGRCV DGIASFSCAC APGYTGTACE SQVDECERSQP CRHGGKCLDL
601 VDKYLCRCPS GTTCVNCEVN IDDCASNPT FGVCRDGINR YDCVQCPGFT GPLCNVEINE
661 CASSPCGEGG SCVDGENGFR CLCPPGSLPP LCLPPSHPCA HEPSCSHGICY DAPGGFRCVC
721 EPGWSCP RCS QSLARDACES QPCRAGGTCS SDGMGFHCTC PFCVQCRQCE LLSPTPMPC
781 HGGRCESAP GQLPVCSCPQ GWQGPCCQD VDECAGPAPC GPHGICINLA GSFSCTHGG
841 YTGPSCDQDI NDCDPNPCLN GSGCQDGVGS FSCSCLPGFA GPRCARDVDE CLSNPCGPGT
901 CTDHVASFTC TCPPGYGGFH CEQDLPCSP SSCFNGGTCV DGVNSFSCLC RPYGTGAHQ
961 HEADPCLSRP CLHGGVCSAA HPGFRCTCLE SFTGPCCQTL VDWCSSRQPCQ NGGRCVQIGA
1021 YCLCPPGWSC RLCDIRSLPC REAAAQIGVR LEQLCQAGCQ CVDEDSSHYC VCPEGRTCSSH
1081 CEQEVDPCLA QPCQHCCICR CYMCCYMCEC LPSYNGDNCE DDVDECASQP CQHGGSCIDL
1141 VARYLCSCPP GTLCVLCEIN EDDCCPCPPL DSGPRCLHNG TCVDLVGGFR CTCPPGYTGL
1201 RCEADINECR SCACHAAHTR DCLQDPGGGF RCLCHAGFSC PRCQTVLSPC ESQPCQHGGQ
1261 CRPSPGPGGG LTFICHCAQP FWGPRCERVA RSCRELQCPV GVPCQQTIPRG PRCAQPPGLS
1321 CPSCRSFPCS PPGASNASCA AAPCLHGGSC RPAPLAPFFR CACAQCGWIGP RCEAPAAAPE
1381 VSEEPRCPR ACQAKRGDQR CDRECNSPGC GWDDGGDCSL VGDPWRQCEA LQCWRLFNNS
1441 RCDPACSSPA CLYDNFDCHA GGRETCNPV YEKYCADHFA DGRCDQGCNT EECGWDGLDC
1501 ASEVPALLAR GVLVLTVLLP PEELLRSSAD FLQRLSAILR TSLRFRLEAH GQAMVFPYHR
1561 PSPGSEPRAR RELAPEVIGS VVMLEIDNRL CLQSPENDHC FPDQAQSAADY LGALSAVERL
1621 DFPYPLRDVR GEPLPEPEPS VPLLPLLVAG AVLLLVILVL GVMVARRKRE HSTLWFPEGF
1681 SLHKDVASGE KGRREPVGQD ALGMKNMAKG ESLMGEVATD WMDTECPKAK RLKVEEPGMG
1741 AEEAVDCRQW IQHHLVAADI RVAPAMALTP PQGDADADGM DVNVRGPDGF TPLMLASFCC
1801 GALEPMPTEE DEADDTSASI ISDLICQCAQ LCARTDRTGE TALHLAARYA RADAARKRLD
1861 AGADTNAQDH SGRTPLEHTAV TADAQGVFQI LIRNRSTDLD ARMADGSTAL ILAARLAVEG
1921 MVEELIASHA DVNAVDELCK SALEWAAAVN NVEATLALLK NCANKDMQDS KEETPLFLAA
1981 REGSYEAAKL LLDHFANREI TDHLDRLEPRD VAQERLHQDI VRLLDQPSGP RSPPGPHGLG
2041 PLLCPPGAFL PGLKAAQSGS KKSRRPPGKA GLGPQGPGRG GKKLTLACPG PLADSSVTL
2101 PVDSLDSPRP FCGPPASPGC FPLEGPYAAA TATAVSLAQL CGPCRAGLGR QPPGCGVL
2161 GLLNPAVAVPL DWARLPPAP PCPSFLLPLA PCPQLLNPGT PVSPQERPPP YLAVPCHCEE
2221 YPVACAHSSP PKARFLRVPS EHPYLTPSPE SPEHWASPS PSLSDWSEST PSPATATGAM
2281 ATTTCALPAQ PLPLSVPSL AQAQTQLCPQ PEVTPKRQVL A (SEQ ID NO 1)

```

Fig. 1

Comparação da Sequência de aminoácido de Notch1, 2, 3 e 4

1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 2A

322	V	C	V	N	G	W	T	G	E	D	C	S	E	N	I	D	D	C	A	S	A	A	C	F	H	G	A	T	C	H	Notch1.pro	
325	V	C	V	N	G	W	S	G	D	D	C	S	P	N	I	D	D	C	A	F	A	S	C	T	P	G	S	T	C	I	Notch2.pro	
301	V	C	V	N	G	W	T	G	E	S	C	S	Q	N	I	D	D	C	A	T	A	V	C	F	H	G	A	T	C	H	Notch3.pro	
341	V	C	V	S	G	W	G	S	T	S	C	E	E	N	I	D	D	C	I	A	A	T	C	A	P	G	S	T	C	I	Notch4.pro	
352	D	R	V	A	S	F	Y	C	E	C	P	H	G	R	T	G	L	L	C	H	L	N	D	A	C	T	E	K	P	C	Notch1.pro	
355	D	R	V	A	S	F	S	C	M	C	P	P	G	K	A	G	L	L	C	H	L	D	D	A	C	T	S	N	P	C	Notch2.pro	
331	D	R	V	A	S	F	Y	C	A	C	P	M	G	K	T	G	L	L	C	H	L	D	D	A	C	V	S	N	P	C	Notch3.pro	
271	D	R	V	S	F	S	C	L	C	P	P	Q	R	T	G	L	L	C	H	L	E	D	M	C	L	S	Q	P	C	Notch4.pro		
382	N	E	G	S	N	C	D	T	N	P	V	N	G	K	A	I	C	T	C	P	S	G	Y	T	G	P	A	C	S	Q	Notch1.pro	
385	H	K	G	A	L	C	D	T	N	P	L	N	G	Q	Y	I	C	T	C	P	Q	G	Y	K	G	A	D	C	T	E	Notch2.pro	
361	H	E	B	A	T	C	D	T	N	P	V	N	G	R	A	I	C	T	C	P	P	G	F	T	G	G	A	C	D	Q	Notch3.pro	
401	H	G	B	A	Q	C	S	T	N	P	L	T	G	S	T	L	C	L	C	Q	P	G	Y	S	G	P	T	C	H	Q	Notch4.pro	
410	D	V	D	E	C	S	L	G	-	-	-	A	N	P	C	E	H	A	G	E	C	I	N	T	L	G	S	F	E	C	Notch1.pro	
411	D	V	D	E	C	A	K	A	N	-	-	-	S	N	P	C	E	H	A	G	E	C	V	H	T	D	C	A	E	H	C	Notch2.pro
391	D	V	D	E	C	S	I	G	-	-	-	A	N	P	C	E	H	L	G	R	C	V	N	T	Q	C	S	F	L	C	Notch3.pro	
431	D	L	D	E	C	L	K	A	Q	Q	G	P	S	P	C	E	H	G	G	S	C	L	N	T	P	G	S	F	N	C	Notch4.pro	
439	Q	C	L	Q	G	Y	T	G	P	R	C	E	I	D	V	N	E	C	V	S	K	P	C	Q	N	D	A	T	C	L	Notch1.pro	
443	E	C	L	X	G	Y	A	G	P	P	C	E	M	D	I	N	E	C	H	S	D	P	P	C	Q	N	D	A	T	C	L	Notch2.pro
418	Q	C	G	R	G	Y	T	G	P	R	C	E	T	D	V	N	E	C	L	S	G	P	P	C	R	N	G	A	T	C	L	Notch3.pro
461	L	C	P	P	G	Y	T	G	S	R	C	E	A	D	H	N	E	C	L	S	Q	P	C	H	P	G	S	T	C	L	Notch4.pro	
469	D	Q	T	G	F	Q	C	I	C	M	P	G	Y	F	G	V	H	C	E	V	N	T	D	E	C	A	S	S	P	Notch1.pro		
472	D	K	I	C	G	F	T	C	L	C	M	P	G	F	K	C	V	H	C	E	L	E	I	N	E	C	Q	S	K	P	Notch2.pro	
448	D	R	I	G	Q	F	T	C	I	C	M	A	G	F	T	S	T	Y	C	E	V	D	I	B	F	C	Q	S	S	P	Notch3.pro	
491	D	L	C	A	T	F	H	C	L	C	P	P	G	L	E	G	Q	L	C	E	V	E	T	N	E	C	A	S	A	P	Notch4.pro	
499	C	L	H	N	G	R	C	L	C	X	I	N	E	F	Q	C	E	C	P	T	G	F	T	G	H	D	C	Q	Y	D	Notch1.pro	
503	C	V	N	G	C	C	V	D	X	V	N	R	F	Q	C	I	C	P	P	G	F	T	G	P	V	C	Q	I	D	Notch2.pro		
478	C	V	N	G	S	V	C	K	D	R	V	N	G	F	S	C	I	C	P	S	G	F	S	G	S	T	C	Q	L	D	Notch3.pro	
521	C	L	N	H	A	D	C	H	D	L	L	N	G	F	Q	C	I	C	L	P	G	F	S	G	T	R	C	F	E	D	Notch4.pro	
529	V	D	E	C	A	S	T	P	C	K	N	G	A	K	C	L	D	G	P	N	C	Y	T	C	V	C	T	E	G	Y	Notch1.pro	
532	I	D	D	C	E	S	T	P	C	R	N	G	A	K	C	I	D	H	P	N	C	Y	E	C	Q	C	A	T	C	F	Notch2.pro	
502	V	D	E	C	A	S	T	P	C	R	N	G	A	K	C	V	D	Q	P	D	G	Y	E	C	R	C	A	E	G	F	Notch3.pro	
551	I	D	E	C	R	S	S	P	C	A	N	G	G	Q	C	Q	D	Q	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro		
559	T	G	T	H	C	E	V	D	I	D	E	C	D	P	D	P	C	H	Y	G	S	C	K	D	G	V	A	T	F	T	Notch1.pro	
563	T	G	V	L	C	E	E	N	I	D	N	C	D	P	D	P	C	H	H	G	Q	C	Q	D	G	I	D	S	Y	T	Notch2.pro	
532	F	G	T	L	C	D	R	N	V	D	D	C	S	P	D	P	C	H	H	G	R	C	V	D	G	I	A	S	F	S	Notch3.pro	
570	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro		
589	C	L	C	R	P	G	Y	F	G	H	H	C	E	T	N	I	N	E	C	S	S	Q	P	C	R	H	G	G	T	C	Notch1.pro	
593	C	I	C	N	P	G	Y	M	G	A	T	C	S	D	Q	I	D	E	C	Y	S	S	P	C	L	N	D	G	R	C	Notch2.pro	
562	C	A	C	A	P	G	Y	T	G	T	R	C	E	S	Q	V	D	E	C	R	S	Q	P	C	R	H	G	G	X	C	Notch3.pro	
574	C	X	C	L	P	G	F	E	G	P	R	C	Q	T	E	V	D	E	C	L	S	D	E	C	E	V	G	A	S	C	Notch4.pro	
619	Q	D	R	D	N	A	Y	L	C	F	C	L	K	S	T	E	G	P	K	C	E	I	N	L	D	D	C	A	S	S	Notch1.pro	
623	I	D	E	V	N	G	Y	Q	C	N	C	Q	P	S	T	E	S	V	N	C	E	I	N	F	D	D	C	A	S	N	Notch2.pro	
592	L	D	L	V	D	E	Y	L	C	R	C	P	S	G	T	T	G	V	N	C	E	V	N	T	D	D	C	A	S	N	Notch3.pro	
604	L	D	L	P	G	A	F	F	C	L	C	P	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro		
649	P	C	D	S	G	T	C	L	D	X	T	D	G	Y	E	C	A	C	E	P	G	Y	T	G	S	M	C	N	I	N	Notch1.pro	
652	P	C	I	H	G	I	C	M	D	G	I	N	R	Y	S	C	V	C	S	P	G	F	T	G	Q	R	C	N	I	D	Notch2.pro	
628	P	C	T	F	G	V	C	R	D	G	I	N	R	Y	D	C	V	C	Q	P	G	F	T	G	P	E	C	N	V	E	Notch3.pro	
617	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro		

Fig. 2B

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

Fig. 2C

1035	G	T	C	Q	D	C	C	S	Y	R	C	T	C	F	Q	C	Y	T	G	F	N	C	Q	H	L	V	H	W	C	Notch1.pro		
1038	G	T	C	V	D	G	L	C	T	Y	R	C	S	C	F	L	S	Y	T	G	K	N	C	Q	T	L	V	N	L	C	Notch2.pro	
975	G	V	C	S	A	A	H	P	G	F	R	C	T	C	L	S	S	F	T	G	P	Q	C	Q	T	L	V	D	W	C	Notch3.pro	
818	A	P	C	Q	D	S	P	Q	G	P	P	C	L	C	F	P	G	Y	T	G	G	S	C	Q	T	L	M	D	L	C	Notch4.pro	
1065	D	S	S	P	C	K	N	G	G	X	C	W	Q	T	H	T	Q	Y	R	C	E	C	P	S	G	N	T	G	L	Y	Notch1.pro	
1068	S	R	S	P	C	K	N	K	G	T	C	V	Q	K	K	A	E	S	Q	C	L	C	P	A	G	N	A	G	A	Y	Notch2.pro	
1005	S	R	Q	P	C	Q	N	C	G	R	C	V	Q	T	G	-	-	A	Y	C	L	C	P	P	G	W	S	C	R	D	Notch3.pro	
848	A	Q	X	P	C	P	R	N	S	P	C	T	Q	T	G	P	S	F	H	C	T	C	T	Q	G	N	T	G	P	L	Notch4.pro	
1095	C	D	V	P	S	V	S	C	E	V	A	A	Q	R	G	G	V	D	V	A	R	L	C	Q	H	G	G	L	C	V	Notch1.pro	
1088	C	D	V	P	N	V	S	C	D	I	A	A	S	R	R	G	V	L	V	B	H	L	C	Q	H	S	G	V	C	I	Notch2.pro	
1033	C	D	I	P	S	L	P	C	R	E	A	A	A	Q	I	G	V	R	L	E	Q	L	C	Q	A	G	G	Q	C	V	Notch3.pro	
878	C	N	L	P	L	S	S	C	Q	K	A	A	L	S	Q	G	I	D	V	S	S	L	C	H	N	G	G	L	C	V	Notch4.pro	
1125	D	A	G	N	T	H	H	C	R	C	Q	A	G	Y	T	G	S	Y	C	B	D	L	V	D	D	C	S	P	S	P	Notch1.pro	
1128	N	A	G	N	T	H	V	C	Q	C	P	L	G	Y	T	G	S	Y	C	B	E	Q	L	D	D	C	A	S	N	P	Notch2.pro	
1063	D	E	D	S	S	H	Y	C	V	C	P	E	G	R	T	G	S	H	C	Q	E	V	D	P	C	L	A	Q	P	Notch3.pro		
908	D	S	G	P	S	Y	F	C	H	C	P	F	G	I	Q	G	S	L	C	Q	D	H	V	N	P	C	E	S	R	P	Notch4.pro	
1159	C	Q	N	C	A	T	C	T	D	Y	L	G	G	Y	S	C	K	C	V	A	G	Y	H	C	V	N	C	S	E	D	Notch1.pro	
1159	C	Q	H	C	A	T	C	S	D	F	I	G	C	Y	R	C	E	C	V	P	C	Y	Q	G	V	N	C	E	Y	E	Notch2.pro	
1093	C	Q	A	C	G	T	C	R	G	Y	M	C	G	Y	M	C	E	C	L	P	G	Y	N	S	D	N	C	E	D	D	Notch3.pro	
938	C	Q	N	G	A	T	C	M	A	Q	E	S	S	Y	L	C	Q	C	A	P	G	Y	L	G	Q	N	C	S	K	E	Notch4.pro	
1185	I	D	E	C	I	S	H	P	C	Q	N	G	C	T	C	L	D	L	P	N	T	Y	K	C	S	C	P	R	G	T	Notch1.pro	
1188	V	D	E	C	Q	N	Q	P	C	Q	N	G	C	T	C	I	D	L	V	N	H	F	K	C	S	C	P	F	S	T	Notch2.pro	
1123	V	D	E	C	A	S	Q	P	C	Q	H	C	C	S	C	I	D	L	V	A	R	Y	L	C	S	C	P	F	S	T	Notch3.pro	
948	I	D	A	C	Q	S	Q	P	C	F	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro	
1215	Q	C	V	H	C	E	F	N	V	D	D	C	N	F	F	V	D	P	V	S	R	S	P	K	C	E	N	N	G	T	Notch1.pro	
1218	R	C	L	L	C	E	E	N	I	D	D	C	-	-	-	-	-	-	-	-	A	P	C	P	E	C	N	C	Q	Notch2.pro		
1153	L	G	V	L	C	E	I	N	E	D	D	C	C	F	G	-	F	P	L	D	S	G	P	R	C	L	H	N	G	T	Notch3.pro	
979	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro	
1245	C	V	D	Q	V	G	G	Y	S	C	T	C	P	P	G	F	V	G	S	R	C	E	G	D	V	N	E	C	L	S	Notch1.pro	
1241	C	N	D	R	I	G	G	Y	S	C	R	C	L	P	G	F	A	G	E	R	C	E	G	D	I	N	E	C	L	S	Notch2.pro	
1182	C	V	D	L	V	G	G	F	R	C	T	C	P	P	G	Y	T	G	L	R	C	E	A	D	I	N	E	C	R	S	Notch3.pro	
982	C	T	P	K	P	C	C	F	H	C	A	C	P	P	G	F	V	G	L	R	C	E	C	D	V	D	E	C	L	D	Notch4.pro	
1275	N	F	C	D	A	R	G	T	Q	N	C	V	Q	R	V	N	-	D	F	H	C	D	C	R	A	G	H	T	G	R	Notch1.pro	
1271	N	P	C	S	S	E	G	S	L	D	C	L	Q	L	T	N	-	D	Y	L	C	V	C	R	S	A	F	T	G	R	Notch2.pro	
1212	G	A	C	H	A	A	H	T	R	D	C	L	Q	D	F	G	G	G	T	R	C	L	C	H	A	G	S	S	G	P	Notch3.pro	
1012	Q	P	C	H	P	T	G	T	A	A	C	H	S	L	A	N	-	A	F	Y	C	Q	C	L	F	G	H	S	G	Q	Notch4.pro	
1304	R	C	E	S	V	I	N	G	C	K	G	K	F	C	K	N	G	G	T	C	A	V	A	S	N	T	A	R	G	-	Notch1.pro	
1300	H	C	E	T	F	V	D	V	C	F	Q	M	P	C	I	N	C	G	T	C	A	V	A	S	N	M	E	D	C	-	Notch2.pro	
1240	R	C	Q	T	V	L	S	P	C	E	S	Q	P	C	Q	H	G	G	Q	C	R	E	S	P	C	P	G	S	C	L	Notch3.pro	
1041	W	C	E	V	E	L	P	C	H	S	Q	P	C	E	H	G	G	T	C	E	A	T	A	G	S	E	L	S	-	Notch4.pro		
1333	-	F	I	C	K	C	F	A	G	F	S	S	A	T	C	E	N	D	A	R	T	C	C	S	L	R	C	L	N	G	Notch1.pro	
1329	-	F	I	C	R	C	F	P	C	G	F	S	C	A	R	C	Q	S	-	-	-	S	C	C	Q	V	K	C	R	K	G	Notch2.pro
1272	T	F	T	C	H	C	A	Q	P	F	W	C	P	R	C	E	R	V	-	A	R	S	C	R	E	L	Q	C	F	V	G	Notch3.pro
1070	-	F	I	C	H	C	F	K	G	F	R	S	P	T	C	S	H	R	A	P	S	C	G	F	H	E	C	H	E	G	Notch4.pro	
1362	G	T	C	L	S	G	F	R	S	-	-	-	P	T	C	L	C	L	G	P	F	T	G	P	S	C	Q	S	P	A	Notch1.pro	
1355	E	Q	C	V	H	T	A	S	G	-	-	-	P	R	C	F	C	P	S	P	R	D	-	-	-	C	E	S	G	C	Notch2.pro	
1302	V	P	C	Q	Q	T	F	R	G	-	-	-	P	R	C	A	C	L	S	G	Y	G	S	P	D	C	L	-	P	P	Notch3.pro	
1099	G	L	C	L	P	S	F	K	P	G	F	P	P	R	C	A	C	L	S	G	Y	G	S	P	D	C	L	-	P	P	Notch4.pro	

Fig. 2D

1369	S	S	P	-	-	-	-	-	C	L	G	C	N	F	C	Y	N	Q	C	I	C	E	P	T	S	-	-	E	S	Notch1.pro		
1379	A	S	-	-	-	-	-	-	-	S	P	C	Q	H	G	G	S	C	R	P	Q	R	-	-	Q	P	-	-	Q	P	Notch2.pro	
1329	G	S	P	P	G	A	S	N	A	S	C	A	A	A	P	C	T	H	G	G	S	C	R	P	A	P	-	-	L	A	Notch3.pro	
1129	A	P	K	G	-	-	-	-	-	C	G	P	P	S	P	C	L	Y	N	G	S	C	S	E	T	T	G	L	G	G	Notch4.pro	
1411	P	F	Y	R	C	L	C	P	A	K	F	N	G	L	L	C	H	I	L	D	Y	S	F	G	G	G	A	G	R	D	Notch1.pro	
1396	P	Y	Y	S	C	Q	C	A	P	F	F	S	G	S	R	C	E	L	Y	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch2.pro	
1357	P	F	E	R	C	A	C	A	Q	G	W	T	G	P	R	C	E	A	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch3.pro	
1154	E	S	T	R	C	S	C	P	H	S	S	P	G	P	R	C	Q	K	P	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro
1441	I	P	P	P	L	I	E	E	A	C	E	L	P	E	C	Q	E	D	A	G	N	K	V	C	S	D	Q	C	N	N	Notch1.pro	
1416	A	P	P	S	T	P	P	A	T	C	L	S	Q	Y	C	A	E	K	A	R	C	G	V	C	D	E	A	C	N	S	Notch2.pro	
1372	A	P	E	V	S	E	E	P	R	C	P	K	A	A	C	Q	A	K	K	E	D	Q	R	C	D	R	E	C	N	S	Notch3.pro	
1174	-	-	-	-	A	K	G	-	-	-	-	-	-	-	-	C	E	G	R	S	C	D	C	A	C	D	A	C	C	S	C	Notch4.pro
1471	H	A	C	G	W	D	G	G	D	C	S	L	N	F	N	D	P	W	K	N	C	T	Q	S	L	Q	C	W	K	Y	Notch1.pro	
1446	H	A	C	Q	W	D	G	G	D	C	S	L	T	M	E	N	P	W	A	N	C	S	S	P	L	P	C	W	D	Y	Notch2.pro	
1405	P	G	C	G	W	D	G	G	D	C	S	L	S	V	G	D	P	W	R	Q	C	-	E	A	L	Q	C	W	R	L	Notch3.pro	
1193	P	G	C	N	W	D	G	G	D	C	S	L	G	V	F	D	P	W	R	G	C	P	S	E	S	R	C	W	L	L	Notch4.pro	
1501	F	S	D	G	F	C	D	S	Q	C	N	S	A	G	C	L	F	E	G	F	L	C	Q	R	A	-	-	E	G	Q	Notch1.pro	
1476	I	N	N	-	Q	C	D	E	L	C	N	T	V	E	C	L	F	D	N	F	E	C	Q	G	N	-	-	S	K	T	Notch2.pro	
1437	F	N	K	S	R	C	D	P	A	C	S	S	P	A	C	L	Y	D	N	F	C	H	A	G	G	R	F	R	T	Notch3.pro		
1223	F	R	D	G	Q	C	H	F	Q	C	D	S	E	F	C	L	F	E	G	Y	D	C	E	T	P	-	-	-	P	A	Notch4.pro	
1529	C	N	F	L	Y	D	Q	Y	C	K	D	H	F	S	D	S	H	C	D	Q	G	C	N	S	A	E	C	E	W	D	Notch1.pro	
1503	C	K	-	-	Y	D	K	Y	C	A	D	H	F	K	D	N	H	C	D	Q	C	C	N	S	E	E	C	C	W	D	Notch2.pro	
1467	C	N	P	V	Y	E	K	Y	C	A	D	H	F	A	E	C	R	C	D	Q	C	C	N	T	E	E	C	C	W	D	Notch3.pro	
1250	C	T	P	A	Y	D	Q	Y	C	H	D	H	F	H	N	G	H	C	E	K	A	C	N	T	A	E	C	G	W	D	Notch4.pro	
1559	G	L	D	C	A	E	H	V	P	T	R	L	A	A	G	T	L	V	V	V	V	L	M	P	P	E	Q	L	R	N	Notch1.pro	
1531	G	L	D	C	A	A	D	Q	P	E	N	L	A	E	G	T	L	V	V	V	V	L	M	P	P	E	Q	L	L	2	Notch2.pro	
1497	G	L	D	C	A	S	E	V	F	A	L	L	A	R	G	V	I	V	L	T	V	L	L	P	P	E	E	L	L	R	Notch3.pro	
1280	G	G	D	C	E	P	E	D	G	D	P	E	W	S	F	S	L	A	L	-	V	L	S	P	P	A	L	D	Q	Notch4.pro		
1529	S	S	F	H	F	I	N	E	L	S	R	V	L	H	T	N	V	V	F	K	R	D	A	H	G	Q	Q	M	I	F	Notch1.pro	
1561	D	A	R	S	F	L	R	A	L	G	T	L	L	H	T	N	L	R	I	K	R	D	S	Q	G	E	L	K	V	Y	Notch2.pro	
1527	S	S	A	D	F	L	Q	R	L	S	A	I	L	R	K	T	S	I	R	F	R	L	D	A	I	G	Q	A	M	V	E	Notch3.pro
1310	Q	L	E	A	L	A	R	V	L	S	L	T	L	R	V	G	L	W	V	R	K	D	S	D	G	R	D	M	V	Y	Notch4.pro	
1619	P	Y	Y	C	R	E	E	E	L	R	K	E	P	I	K	R	A	A	E	C	W	A	A	P	D	A	L	L	C	Q	Notch1.pro	
1591	P	Y	Y	C	E	K	S	A	A	N	K	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch2.pro	
1557	P	Y	H	R	P	S	P	G	S	E	P	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch3.pro	
1340	P	Y	F	G	A	R	A	E	E	K	L	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro	
1649	V	K	A	S	L	L	P	G	G	S	E	G	G	R	R	R	R	E	L	C	E	M	D	V	R	G	S	I	V	Y	Notch1.pro	
1605	M	T	R	R	S	L	P	G	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch2.pro	
1569	A	R	R	E	L	A	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch3.pro	
1362	A	A	F	Q	T	Q	P	L	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro	
1679	L	E	I	D	N	R	Q	C	V	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch1.pro	
1625	L	E	I	D	N	R	Q	C	V	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch2.pro	
1584	L	E	I	D	N	R	L	C	L	Q	S	P	E	N	C	H	C	F	P	D	A	Q	S	A	A	C	Y	L	G	A	Notch3.pro	
1324	M	G	V	D	L	S	R	C	G	F	D	H	P	A	S	R	C	P	W	D	E	G	L	L	L	R	E	L	A	A	Notch4.pro	
1707	L	A	S	L	G	S	L	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch1.pro	
1653	H	A	I	Q	G	T	L	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch2.pro	
1614	L	S	A	V	E	R	L	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch3.pro	
1414	M	A	A	V	G	A	L	F	P	L	L	P	G	F	L	L	A	V	E	P	H	A	G	T	A	P	F	A	N	Q	Notch4.pro	

Fig. 2E

1733	-	A	Q	T	H	F	M	Y	V	A	A	A	A	F	V	L	F	F	V	G	C	G	V	L	I	S	R	K	R		Notch1.pro	
1674	-	E	R	T	Q	L	L	Y	L	L	A	V	A	V	V	I	I	L	F	I	I	L	L	G	V	M	A	K	R		Notch2.pro	
1639	-	P	S	V	P	L	L	P	L	L	V	A	G	A	V	L	L	V	I	L	V	L	G	V	M	V	A	K	R		Notch3.pro	
1444	-	P	W	P	V	L	C	S	P	V	A	G	V	I	-	L	A	L	G	A	L	L	V	L	Q	L	I	A	K	R		Notch4.pro
1762	R	R	Q	H	G	Q	L	W	F	P	E	G	F	K	V	S	-	E	A	S	K	-	-	K	K	R	R	E	P	L		Notch1.pro
1703	K	R	K	H	G	S	L	W	L	P	E	G	F	T	L	K	R	D	A	S	N	-	-	H	K	R	R	E	P	V		Notch2.pro
1668	K	R	E	H	S	T	L	W	F	P	E	G	F	S	L	H	K	D	V	A	S	G	H	K	G	R	R	E	P	V		Notch3.pro
1474	E	R	E	H	G	A	L	W	L	P	P	G	F	T	R	R	P	R	T	Q	S	A	P	H	R	R	R	P	P	L		Notch4.pro
1789	G	E	D	S	V	G	L	K	P	L	K	N	-	A	S	D	G	A	L	E	D	D	N	Q	N	F	-	-	W	G		Notch1.pro
1741	G	Q	D	A	V	G	L	K	N	L	S	V	Q	V	S	E	A	N	L	I	G	T	G	T	S	E	H	W	V	D		Notch2.pro
1698	G	Q	D	A	L	G	M	K	K	M	A	K	-	-	G	E	S	L	E	S	E	V	A	T	D	-	W	M	D		Notch3.pro	
1504	G	E	D	S	I	G	L	K	A	L	E	P						K	A	K	V	D	S	D	G	V	V	M			Notch4.pro	
1816	D	E	D	L	E	T	K	K	P	R	F	E	E	P	V	V	L	P	D	L	D	D	Q	T	D	H	R	Q	W	T		Notch1.pro
1761	D	E	G	F	Q	P	K	K	V	K	A	E	D	E	A	L	L	S	E	L	D	D	P	I	D	R	R	F	W	T		Notch2.pro
1724	I	S	C	P	E	A	K	R	L	K	V	E	E	P	S	M	G	-	-	A	E	E	A	V	D	C	R	Q	W	T		Notch3.pro
1527	C	S	G	P	E				E	G	E	E	V	G	Q	A	E	E	I	G	P	P	S	T	C	Q	L	W	S		Notch4.pro	
1846	Q	Q	H	L	D	A	A	D	L	R	-	H	S	A	K	A	P	T	P	F	Q	G	E	V	D	A	D	C	M	D		Notch1.pro
1791	Q	Q	H	L	E	A	A	D	I	R	R	T	P	S	-	A	T	P	E	Q	A	E	Q	E	V	D	V	L	D		Notch2.pro	
1752	Q	H	H	L	V	A	A	D	I	R	V	A	P	A	K	A	L	T	P	F	Q	G	D	A	D	A	D	G	M	D		Notch3.pro
1553	-	S	G	C	G	A	L	Q	Q	-	-	-	A	A	M	L	T	P	P	Q	-	K	S	P	V	P	A	D	D		Notch4.pro	
1875	V	N	V	R	P	D	G	P	I	P	L	M	I	A	S	C	S	G	G	C	P	E	T	G	N	S	K	E	-		Notch1.pro	
1821	V	N	V	R	P	D	G	C	I	P	L	M	L	A	S	F	R	G	G	S	S	D	L	S	D	E	D	E	D		Notch2.pro	
1782	V	N	V	R	P	D	G	P	I	P	L	M	L	A	S	F	C	G	G	A	T	E	P	M	P	I	K	E	D		Notch3.pro	
1579	L	D	I	R	P	D	G	V	I	P	L	M	S	A	V	C	C	G	-	E	V	Q	S	G	I	F	Q	G	-		Notch4.pro	
1904	-	-	E	E	D	A	P	A	V	I	S	D	F	I	Y	Q	G	A	S	L	H	N	Q	T	D	R	I	G	E	T		Notch1.pro
1851	-	A	E	D	S	S	A	N	I	I	E	D	L	V	Y	Q	G	A	S	L	Q	A	Q	T	D	R	I	G	E	M		Notch2.pro
1812	E	A	D	D	I	S	A	S	I	I	S	D	L	I	C	Q	G	A	Q	L	G	A	R	T	D	R	I	G	E	T		Notch3.pro
1607	-	A	W	L	G	C	P	E	P	W	E	P	L	L	D	G	G	A	C	P	Q	A	H	T	V	G	I	G	S	T		Notch4.pro
1932	A	L	H	L	A	A	R	Y	S	R	S	D	A	A	K	R	L	L	E	A	S	A	D	A	N	L	C	C	N	M		Notch1.pro
1880	A	L	H	L	A	A	R	Y	S	R	A	D	A	A	K	R	L	L	D	A	S	A	D	A	N	A	Q	C	N	M		Notch2.pro
1842	A	L	H	L	A	A	R	Y	A	R	A	D	A	A	K	R	L	L	D	A	S	A	D	T	N	A	Q	C	H	S		Notch3.pro
1636	F	L	H	L	A	A	R	P	S	R	P	T	A	A	K	R	L	L	E	A	G	A	N	P	N	Q	E	D	R	A		Notch4.pro
1962	G	R	I	F	L	H	A	A	V	A	D	A	Q	G	V	F	Q	I	L	I	R	N	R	A	T	D	L	D	A		Notch1.pro	
1910	G	R	I	F	L	H	A	A	V	A	D	A	Q	G	V	F	Q	I	L	I	R	N	R	V	T	D	L	D	A		Notch2.pro	
1872	G	R	I	F	L	H	A	A	V	A	D	A	Q	G	V	F	Q	I	L	I	R	N	R	S	T	D	L	D	A		Notch3.pro	
1666	G	R	I	F	L	H	A	A	V	A	D	A	R	E	V	C	Q	L	L	L	R	S	R	Q	I	A	V	D	A		Notch4.pro	
1992	R	M	H	D	G	T	T	P	L	M	I	A	A	R	-	A	V	E	G	V	L	E	D	L	I	N	S	H	A	D		Notch1.pro
1940	R	M	N	D	G	T	T	P	L	M	I	A	A	R	-	A	V	E	G	V	V	A	R	L	I	N	C	Q	A	D		Notch2.pro
1902	R	M	A	D	G	S	T	A	L	I	L	A	A	R	-	A	V	E	G	V	V	E	S	L	I	A	S	H	A	D		Notch3.pro
1696	R	T	E	D	G	T	T	P	L	M	I	A	A	R	-	A	V	E	D	I	V	P	E	L	I	A	A	Q	A	D		Notch4.pro
2022	V	N	A	V	D	E	L	G	K	S	A	L	H	W	A	A	A	V	N	K	V	D	A	A	V	V	L	L	K	N		Notch1.pro
1970	V	N	A	V	D	E	H	G	K	S	A	L	H	W	A	A	A	V	N	K	V	E	A	T	L	L	L	L	K	N		Notch2.pro
1932	V	N	A	V	D	E	L	G	K	S	A	L	H	W	A	A	A	V	N	K	V	E	A	T	L	L	L	L	K	N		Notch3.pro
1726	V	G	A	R	D	K	W	G	K	T	A	L	H	W	A	A	A	V	N	K	A	R	A	A	R	S	L	L	Q	A		Notch4.pro
2052	G	A	N	K	D	M	Q	N	N	R	E	E	T	F	L	F	L	A	A	R	E	G	S	Y	E	I	A	K	V	L		Notch1.pro
2000	G	A	N	K	D	M	Q	D	N	K	E	E	T	F	L	F	L	A	A	R	E	G	S	Y	E	A	A	K	I	L		Notch2.pro
1962	G	A	N	K	D	M	Q	D	S	K	E	E	T	F	L	F	L	A	A	R	E	G	S	Y	E	A	A	K	L	L		Notch3.pro
1756	G	A	D	K	D	A	O	D	N	R	R	O	T	P	L	F	L	A	A	R	E	G	A	V	E	V	A	Q	L	L		Notch4.pro

Fig. 2F

2082	L D H F A N R N D I T D H M D R L P R D V A Q E R M H H D I V		Notch1.pro
2090	L B H F A N R D I T D H M D R L P R D V A K D R M H H D I V		Notch2.pro
1992	L D H F A N R E I T D H L D R L P R D V A Q E R M H H Q D I V		Notch3.pro
1766	L G L G A A R E L R D Q A G L A P A D V A H Q R N H W D L I		Notch4.pro
2112	R L L D E Y N L V R S P Q - H C A P L G C I P T L S P F I C		Notch1.pro
2060	R L L D E Y N V I P S P - - P G I V L - - I S A - S P V I C		Notch2.pro
2022	R L L D Q P S U P R S P - - P G P E G - - - - L G P L I C		Notch3.pro
1816	T L L E G A G P P R A K - - - - - - - - - - -		Notch4.pro
2142	S P N G Y I G S L K P G V Q S - K K V X K P S S K - - - -		Notch1.pro
2086	G P N R S F I S L K R T P M G - K K S R R P P S T M P T		Notch2.pro
2046	P P G A F I P G L K A A Q S G S K K S R R P P P G K - - -		Notch3.pro
1622	- -		Notch4.pro
2166	G L A C G S K E A F D L K - A R R K K S Q D G E G C L L D S		Notch1.pro
2115	S L P N N A K R A K D A K G S R R K K S L S E K V Q L S S S		Notch2.pro
2070	- - - - - A G I G P Q G P R G R G K K L T L A C P G P L A D S		Notch3.pro
1844	- -		Notch4.pro
2195	S G M L S P V D S L E S S P H T Y L S D V A S P P L I P S P -		Notch1.pro
2145	S V I L S P V D S L E S S P H T Y L S D V A S P P L I P S P G		Notch2.pro
2096	S V I L S P V D S L E S S P H T Y L S D V A S P P L I P S P -		Notch3.pro
1846	S V S V P P H G G G A L P R C R T L S A G A G E R G G - - -		Notch4.pro
2224	F Q G S F S V F L N H L P G M P D T H L G I G H L N V A A K		Notch1.pro
2175	I L Q A S P N F K L A T A A P P A F V H A Q H A L S T S N L		Notch2.pro
2123	- -		Notch3.pro
1873	- -		Notch4.pro
2254	P E M A A I G G G G R L A F E T G P P R L S H L P V A O G T		Notch1.pro
2205	H E M Q P I A H C A S T V L P S V S C L L S E H H I V S -		Notch2.pro
2135	V S L A Q L G C P O R A G L G R Q P E - - - - - - - - -		Notch3.pro
1883	V D L A A R G C C A Y S H C R S L S C - - - - - - - - -		Notch4.pro
2284	S T V L G S S S G G A L N F T V G G S T S L N G Q C E W L S		Notch1.pro
2273	- - - P G S G S A G S L S R - - - - - L H P V P V P A D W M N		Notch2.pro
2154	- - - - - G C C V L S L G L - - - - - L N P V A V P L D W A R		Notch3.pro
1902	- - - - - V G G A G G - - - - - - - - - - - - - - -		Notch4.pro
2314	R L Q S G M V F N Q Y N P L R G S V V A E G F L S Q A P S L		Notch1.pro
2256	R M E V N E T - - Q Y N E M F G M V A P A E G T H P G - -		Notch2.pro
2175	- -		Notch3.pro
1908	- -		Notch4.pro
2344	Q H C K V G P L E S S L A A S A L S Q M M S Y Q G L P S T R		Notch1.pro
2282	- -		Notch2.pro
2185	- -		Notch3.pro
1915	- -		Notch4.pro
2374	L A T Q F H L V Q T Q Q V Q P Q N L G M Q Q Q N I Q P A N I		Notch1.pro
2288	P A P G K H I I T T P R E P L P P - - I V T E Q - - L I P K - -		Notch2.pro
2189	L A P G P Q L L N P G T P V S P - - - - - - - - - - -		Notch3.pro
1915	- -		Notch4.pro
2404	Q Q Q Q S I Q P P P P P P P Q P H L G V S S A A S G H I G R S		Notch1.pro
2313	- - - - - G S T A G P A G A P Q P G S T G P P A V A G P I L P T M		Notch2.pro
2265	- - - - - Q E R A Q P P P Y L A V P G S G E Z Y F V A G G - - -		Notch3.pro
1924	- - - - - - - - - - - F N P A I M R G K Y G V A A C R C G - - -		Notch4.pro

Fig. 2G

9/27

2434	F	L	S	G	E	P	S	Q	A	D	V	Q	P	L	G	P	S	S	L	A	V	H	T	I	L	P	Q	E	S	P	Notch1.pro
2340	Y	Q	I	-	-	P	-	-	-	E	M	A	R	L	P	S	V	A	F	E	T	A	M	M	P	Q	Q	D	G	Q	Notch2.pro
2226	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	H	S	S	P	P	K	A	R	E	L	R	-	-	-	-	Notch3.pro	
1842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Notch4.pro		
2464	A	L	P	T	S	L	P	S	S	L	V	P	P	V	T	A	A	Q	F	L	T	P	P	S	Q	H	S	Y	S	S	Notch1.pro
2365	V	A	Q	T	I	L	P	A	Y	H	P	T	P	A	S	V	G	K	Y	F	T	P	P	S	Q	H	S	Y	A	S	Notch2.pro
2238	-	V	P	S	E	H	P	Y	I	T	P	S	P	E	S	P	E	H	W	A	S	P	S	P	P	S	I	S	D	W	Notch3.pro
1842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	V	S	T	D	D	W	P	C	D	W	V	A	L	G	A	C	G	Notch4.pro
2494	P	-	-	V	D	N	T	P	S	H	Q	L	Q	V	P	-	E	H	P	F	L	T	P	S	P	E	S	P	D	Q	Notch1.pro
2395	S	N	A	A	E	R	T	P	S	H	S	G	H	L	Q	G	E	H	P	Y	L	T	P	S	P	E	S	P	D	Q	Notch2.pro
2267	S	-	-	-	E	S	T	P	S	P	A	T	A	T	G	-	-	-	A	M	A	T	T	T	G	A	L	P	A	Q	Notch3.pro
1960	S	-	-	A	S	N	I	P	-	-	-	-	I	P	P	-	-	P	C	L	T	P	S	P	E	R	G	S	P	Notch4.pro	
2521	-	W	S	S	S	S	P	V	S	N	V	S	D	W	S	E	G	V	S	S	P	P	T	S	M	Q	S	Q	L	A	Notch1.pro
2425	-	W	S	S	S	S	P	V	S	-	A	S	D	W	S	D	V	T	T	S	P	T	P	G	G	A	G	G	Q	Notch2.pro	
2391	P	L	P	L	S	V	P	S	S	L	A	Q	A	Q	T	Q	L	G	P	Q	P	E	V	T	P	K	R	Q	V	L	Notch3.pro
1981	Q	L	D	C	G	P	P	A	L	Q	E	M	P	I	N	Q	G	G	E	G	K	K								Notch4.pro	
2550	R	I	P	E	A	F	K																							Notch1.pro	
2453	R	G	P	S	T	H	M	S	E	P	P	H	N	N	M	Q	V	Y	A												Notch2.pro
2321	A																														Notch3.pro
2002																															Notch4.pro

Fig. 2H

Estatísticas de alinhamento de sequência de aminoácido para Notch 1-4

Identidade Percentual							
Divergência	1	2	3	4			
	1		56.1	52.7	42.6	1	Notch1
	2	64.9		52.7	42.5	2	Notch2
	3	73.0	72.9		43.4	3	Notch3
	4	102.0	102.4	99.3		4	Notch4
		1	2	3	4		

Fig. 3

11/27

Sequência de região variável de cadeia pesada de mAb 256A-4

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSHYYSWVRQTPEKRLEWVAYISNGGGRTD
CDR-H1 CDR-H2

Y PDSVKGRF'TISRDNAKNTLHLQMSSLKSEDTAMYYCTRLDYFGGSPYFDYWGGQTTLT
CDR-H3

VSSA

(SEQ ID NO: 2)

Fig. 4A

Sequência de região de cadeia leve (kappa) de mAb 256A-4

EIVLTQSPAITAASLGQKVTITCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKPKWIYEISKLASGVPP
CDR-L1 CDR-L2

RFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAAIYYCQQWNYPLITFGSGTKLEIKRADAAPTV
CDR-L3

(SEQ ID NO: 3)

Fig. 4B

12/27

Sequência de região variável de cadeia pesada de mAb 256A-8

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTEFSHYYSWVRQTPEKRLEWVAYINSGGGRTD
CDR-H1 CDR-H2

YPDSVKGRF"TISRDNAKNTLHLQMSSLKSEDTAMY⁺YCARLDYYGGSPYFDYWGQGTTLT
CDR-H3

VSSA

(SEQ ID NO: 4)

Fig. 5A

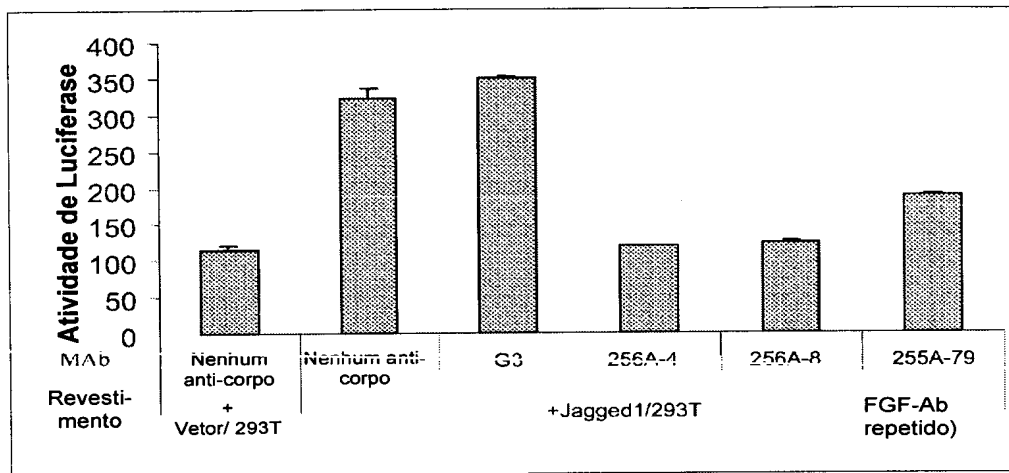
Sequência de região de cadeia leve (kappa) de mAb 256A-8

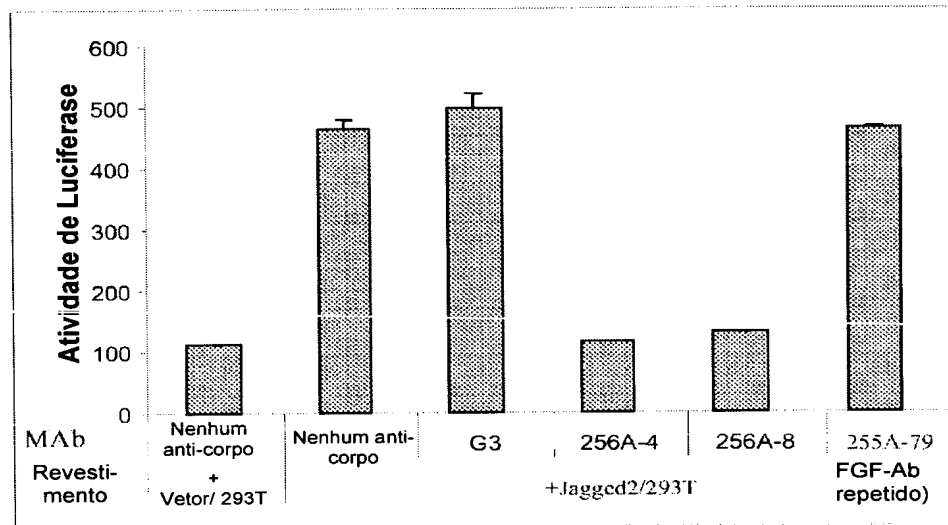
EIVLTQSPAITAASLGQKVTITCSASSSVSYMH⁺WYQQKSGTSPKPWI⁺YEISKLASGVPA
CDR-L1 CDR-L2

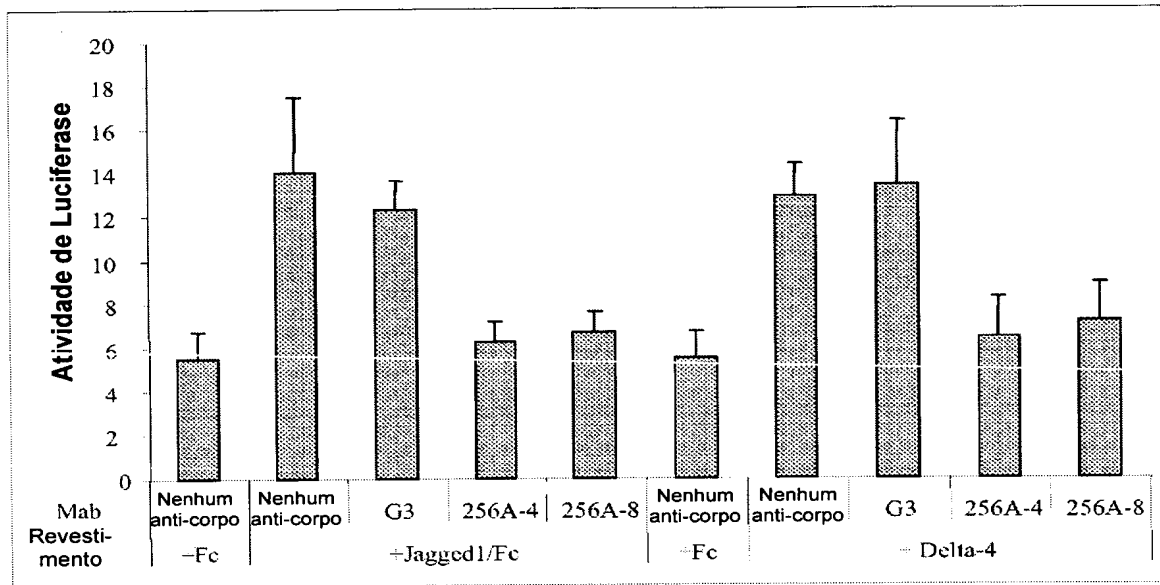
RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAIYYCQQWNYPLITFGSGTKLEIKRADAAPTV
CDR-L3

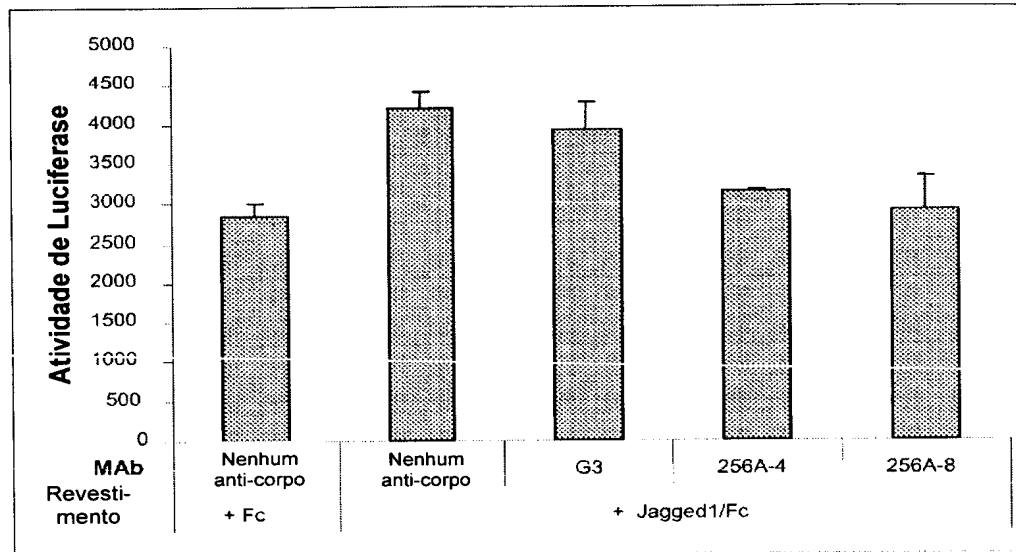
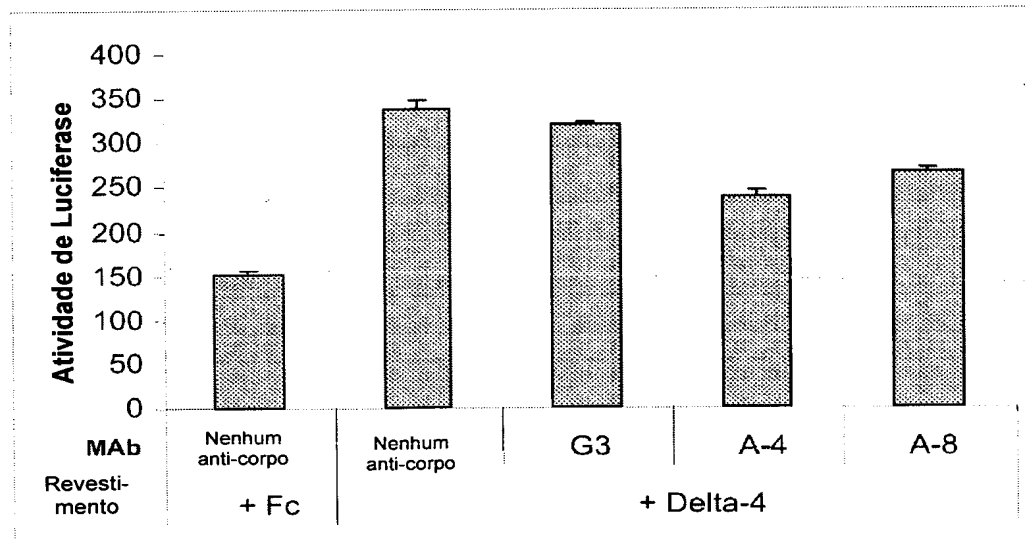
(SEQ ID NO: 5)

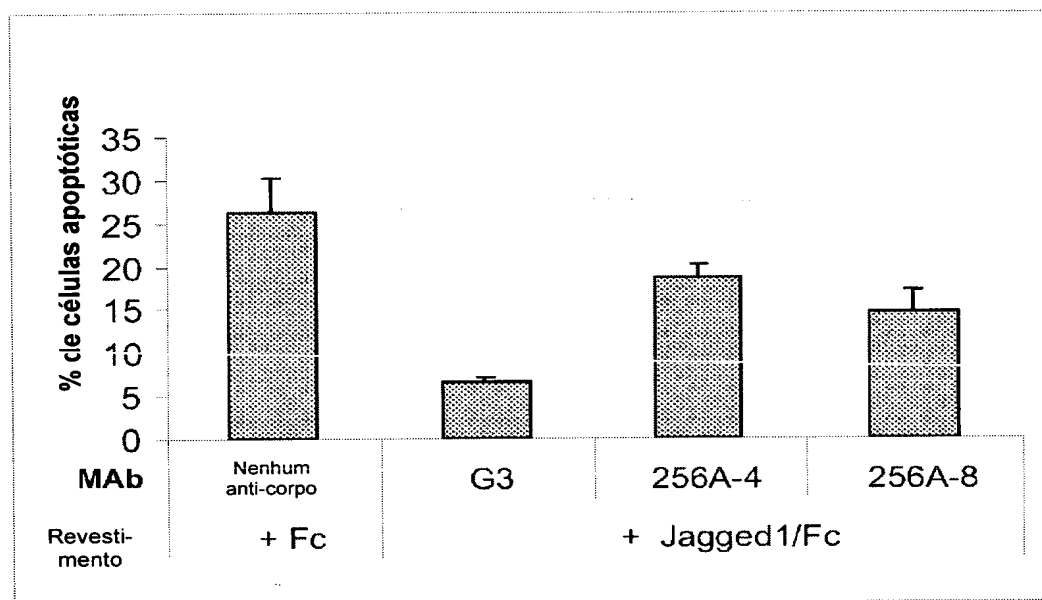
Fig. 5B

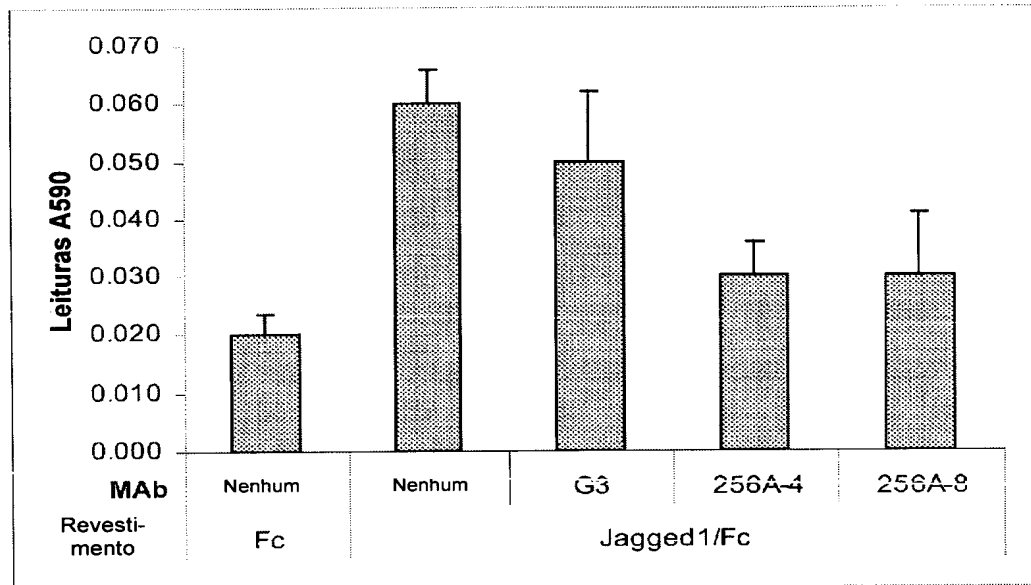
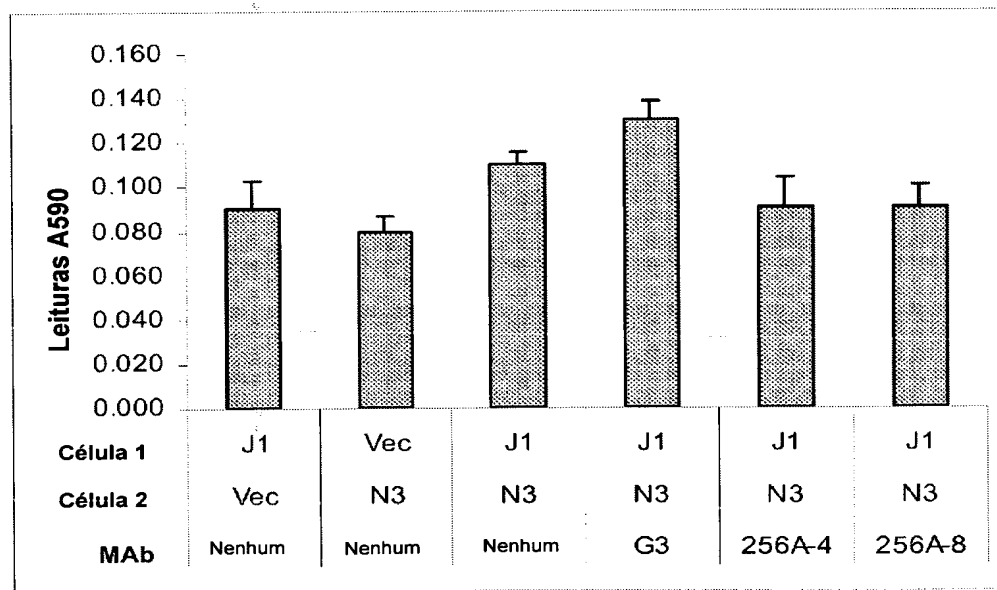
Inibição do anticorpo anti-Notch 3 de irregular 1**Fig. 6**

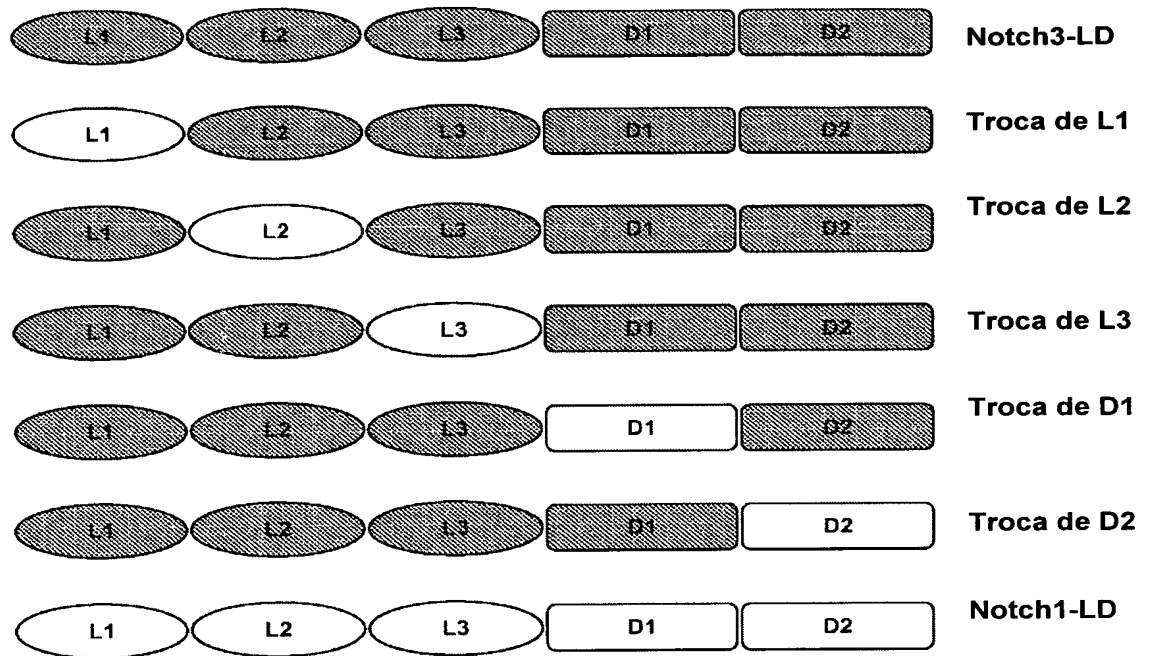
Inibição do anticorpo anti-Notch 3 de irregular 2**Fig. 7**

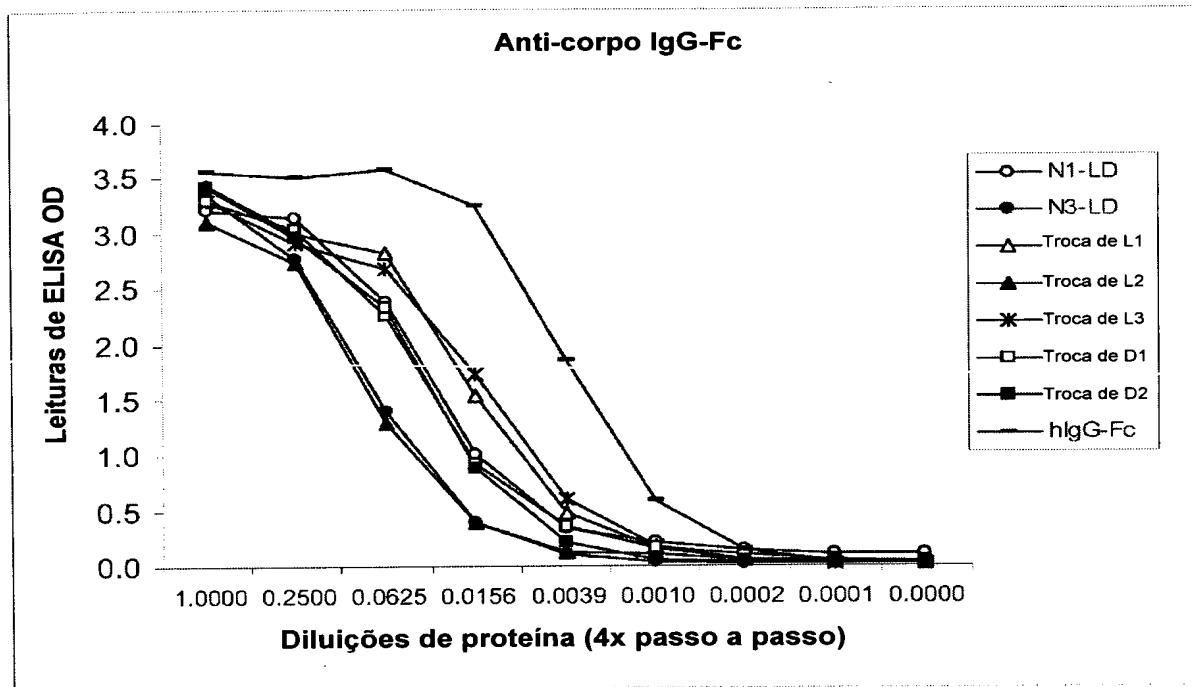
Inibição do anticorpo anti-Notch 3 de DELTA-4**Fig. 8**

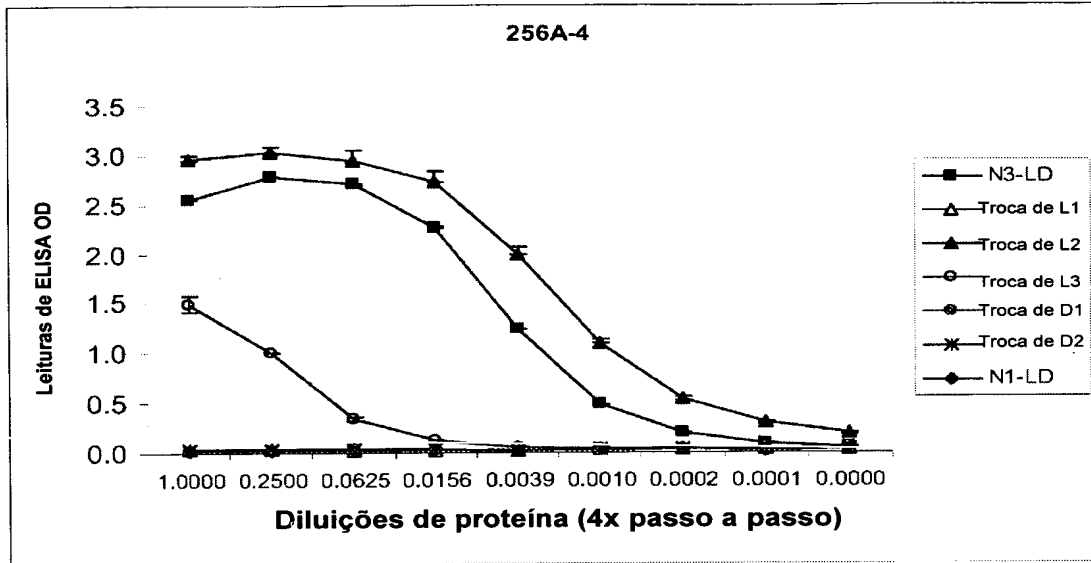
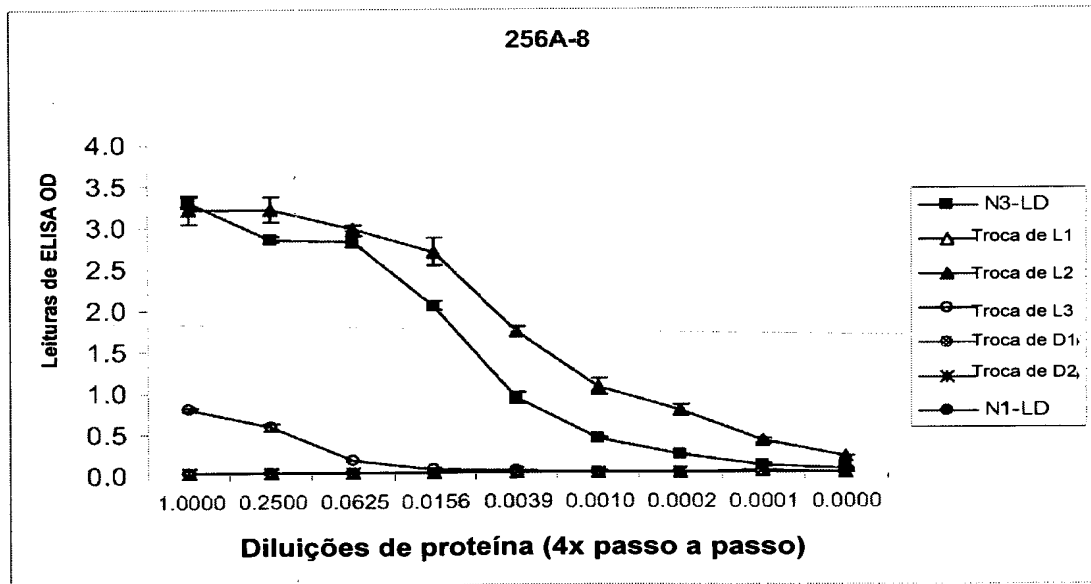
**Fig. 9A****Fig. 9B**

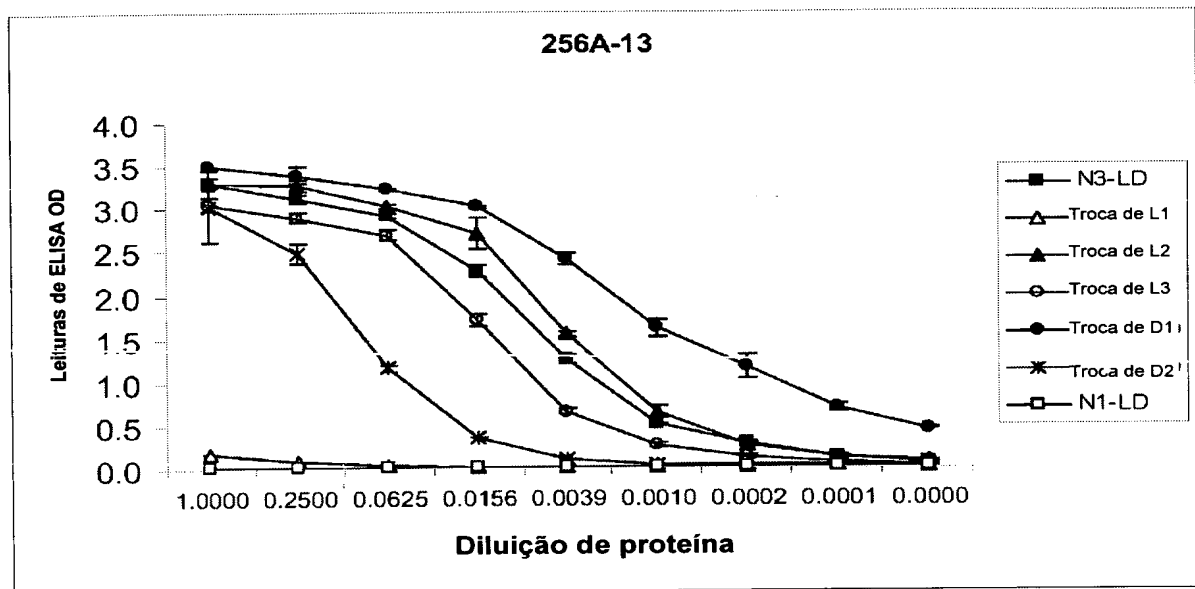
**Fig. 10**

**Fig. 11A****Fig. 11B**

**Fig. 12**

**Fig. 13A**

**Fig. 13B****Fig. 13C**

**Fig. 13D**

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

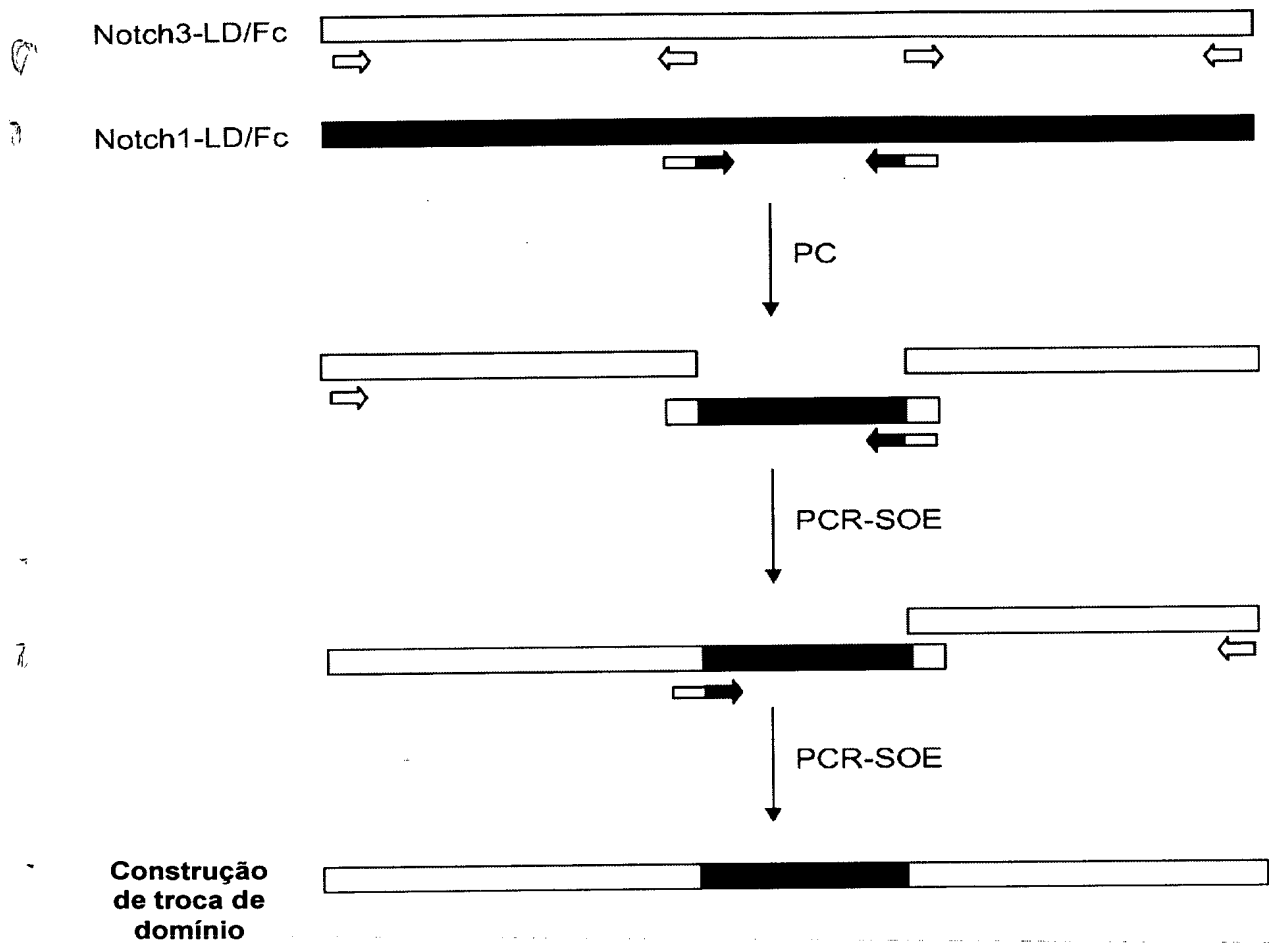
Fig. 14A

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

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

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

Fig. 14B

**Fig. 15**

Sumário de sequência de troca de subdomínio e troca de grupo de aminoácido (aa) no primeiro domínio LIN 12 e força de ligação de Mab nas análises ELISA

Construção de expressão	SEQ ID NC	Tipo selvagem e sequências trocadas do 1º domínio LIN 12(L1) de Notch 3	256A-4	256A-8	G3	% diff
Notch3-L1	9	EPRCPRAACQAKRCQRCQRCRECNSPGCGWEGGDCSLSVG	+++	+++	-	0
L1-sub1	10	-EACELPE-----	+++	+++	-	15.34
L1-sub2	11	-----EDACNKVCS-----	-	-	-	17.95
L1-sub3	12	-----LQCNNHACGWEGGDCSLENFN	-	-	-	20.51
L1-aa swap1	13	-----EDA-----	+	-	-	7.69
L1-aa swap2	14	-----NKV-----	++	+	-	7.69
L1-aa swap3	15	-----SLQ-----	-	-	-	7.69
L1-aa swap4	16	-----NHA-----	+++	+++	-	7.69
L1-aa swap5	17	-----NFN	-	-	-	7.69

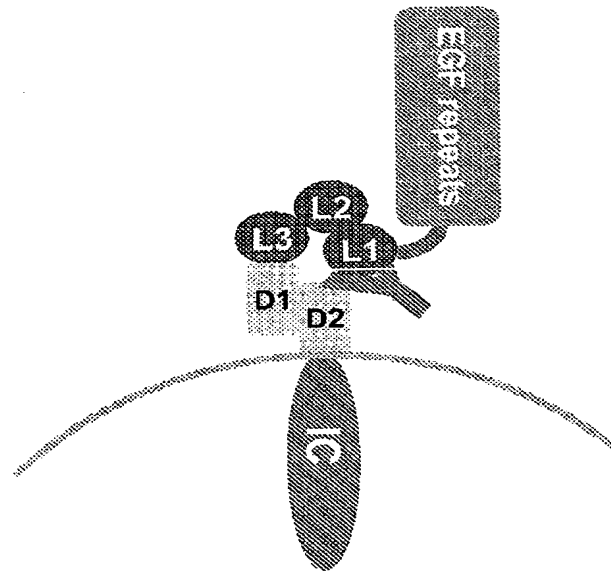
Fig. 16

Sumário de sequência de troca de subdomínio e troca de grupo de aminoácido (aa) no segundo domínio de dimerização e força de ligação Mab em análises ELISA

Construção de expressão	SEQ ID NO	Tipo selvagem e sequências do domínio da 2ª dimerização Notch 3(D2)	256A-4	256A-8	G3	% diff
Notch3-D2	18	ELAPEVIGSVVMELEIDNRLC-QSPENDHCFFDPAQSAADYLGALSAVERLDFFYPRLRDVRCPELEPPPS	+++	+++	-	0
D2-sub1	19	---DVRGSIVY---	-	-	-	5.80
D2-aa swap1	20	---DVR---	-	-	-	2.90
D2-aa swap2	21	---IVY---	+++	+++	-	2.90
D2-sub2	22	---QCVAQAASSQ---	+++	+++	-	11.59
D2-sub3	23	---QSARTAAAF---	+++	+++	-	10.14
D2-sub4	24	---ASLGSINI---	-	-	-	10.14
D2-aa swap3	25	---ASL---	+++	+++	-	4.35
D2-aa swap4	26	---GS---	+++	+++	-	2.90
D2-aa swap5	27	---NI---	+++	+++	-	2.90
D2-sub5	28	---KIEAVQSETVEPPA---	++	+	-	13.04
D2-aa swap6	29	---KIE---	-	-	-	4.35
D2-aa swap7	30	---AVQS---	+++	+++	-	4.35
D2-aa swap8	31	---TVEPPA---	+++	+++	-	4.35

Fig. 17

Esquemática da ligação epítopo



Notch3

Fig. 18

RESUMO

“REGIÕES VARIÁVEIS DA CADEIA PESDADA (“VH”), SEQUÊNCIAS DA CADEIA VH, ÁCIDO NUCLEÍCO, VETOR, CÉLULA, ANTICORPOS, USO DO ANTICORPO, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO , ANTICORPO ANTI-NOTCH3 E FORMA HUMANIZADA DO ANTICORPO”

5

A presente invenção refere-se aos anticorpos antagonistas que especificamente se ligam ao Notch3 e inibem sua ativação. A presente invenção inclui anticorpos que se ligam a um epitopo conformacional que compreende o primeiro domínio de dimerização LIN12 e o segundo domínio de dimerização. A presente invenção também inclui usos destes anticorpos para tratar ou prevenir doenças ou disfunções relacionadas ao Notch3.

10