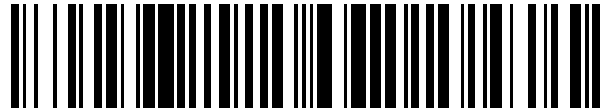


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 929**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 08733125 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2137217**

54 Título: **Métodos para inhibir la unión de endosialina a ligandos**

30 Prioridad:

05.04.2007 US 910362 P
15.10.2007 US 980026 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2014

73 Titular/es:

MORPHOTEK, INC. (100.0%)
210 WELSH POOL ROAD
EXTON, PA 19341, US

72 Inventor/es:

ZHOU, YUHONG;
TOMKOWICZ, BRIAN E.;
GRASSO, LUIGI;
SASS, PHILIP M. y
NICOLAIDES, NICHOLAS C.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 452 929 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para inhibir la unión de endosialina a ligandos

Campo

5 La invención se refiere en general al campo de los productos inmunoterapéuticos. De manera más específica, la invención se refiere a composiciones para la alteración de la interacción de endosialina con sus sustratos para inhibir funciones celulares, que incluyen la angiogénesis y la motilidad celular.

Antecedentes

A lo largo de la memoria descriptiva se citan diversas publicaciones, que incluyen patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos.

10 La angiogénesis es un proceso regulado que implica la formación de vasos sanguíneos nuevos. Desempeña un papel esencial en el crecimiento normal, el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, y otros procesos fisiológicos (Yancopoulos *et al.* (2000) *Nature*, 407:242-8). En el capilar en desarrollo, las proteínas de la matriz extracelular (ECM) sirven como armazón estructural para los tejidos endoteliales y tumorales en proliferación, y proporcionan soporte para el crecimiento de las células tumorales. La angiogénesis *de novo* está implicada en varios estados patológicos, que incluyen el cáncer, en los que la formación de nuevos vasos sanguíneos "similares a los embrionarios" (denominada neovascularización en la presente memoria) parece que difiere de la vasculatura normal con respecto a la estructura y la función (Hanahan *et al.* (2000) *Cell*, 100:57-70). Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado las diferencias biológicas entre la vasculatura normal y la vasculatura asociada a enfermedades mediante el uso de diversos sistemas de modelos de angiogénesis, lo que ha generado la posibilidad de nuevos compuestos anti-angiogénicos que pueden inhibir de manera selectiva la formación de vasos de células endoteliales de tipo embrionario asociadas a tumores para la terapia de una enfermedad neovascular. En vista de estas oportunidades para la terapia, se está llevando a cabo una búsqueda intensa de posibles objetivos que puedan inhibir de manera específica el crecimiento y la función de las células endoteliales o estromales asociadas a tumores y a otras enfermedades neovasculares (fibroblastos, pericitos, etc.).

25 En un intento de identificar tales objetivos, se han diseñado estrategias para identificar los antígenos de la superficie celular del estroma tumoral así como de proteínas específicas aisladas o ARN que se expresan en las células estromales tumorales (Rettig *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10832-6; St. Croix *et al.* (2000) *Science*, 289:1197-1202). Estas estrategias han identificado una proteína de la superficie celular que parece expresarse de manera específica en las células estromales tumorales denominada endosialina (o marcador endotelial tumoral 1 (TEM1) o CD248).

30 El examen de los patrones de expresión de genes en el tejido normal y en el neoplásico indica la estimulación de la expresión del mRNA de endosialina en los neovasos tumorales. (St Croix *et al.* (2000) *Science*, 289:1197-1202). Se observaron niveles de expresión de endosialina similares en el cáncer colorrectal humano (Rmali *et al.* (2005) *World J. Gastroenterol.*, 11:1283-1286), tejidos de cáncer de mama (Davies *et al.* (2004) *Clin. Exp. Metastasis*, 21:31-37), e histiocitomas (Dolznig *et al.* (2005) *Cancer Immun.*, 5:10). Se ha observado la expresión de endosialina humana en el glioblastoma sumamente invasivo, los astrocitomas anaplásicos, y los carcinomas metastásicos, que incluyen los melanomas (Brady *et al.* (2004) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63:1274-1283; Huber *et al.* (2006) *J. Cutan. Pathol.*, 33:145-155).

40 El uso de anticuerpos en estudios de inmunohistoquímica ha descubierto una expresión intensa de endosialina en varias células endoteliales neovasculares, fibroblastos y/o pericitos (Virgintino *et al.* (2007) *Angiogenesis*, 10:35-45) en tejidos cancerosos, mientras la expresión es limitada en líneas celulares derivadas de cultivos endoteliales similares a los embrionarios tales como, pero sin limitación, HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) o HMVEC (células endoteliales microvasculares dérmicas neonatales). El análisis de los anticuerpos, polipéptidos o ligandos no proteicos que se pueden unir a endosialina ha identificado un subgrupo de tales moléculas que pueden inhibir la capacidad de la endosialina de unirse a su sustrato y/o inhibir las actividades intracelulares que conducen a la estasis o muerte celular.

50 Rettig *et al.* describió anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos en vasos en diversos tipos de cáncer (Rettig *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10832-6). Uno de estos se denominó FB5 y se generó por medio de la inmunización de ratones con fibroblastos embrionarios humanos. FB5 reconoce una proteína de ~100 kDa en la superficie de una línea celular de neuroblastoma, LA1-5s (patente de EE.UU. nº 5.342.757). FB5 es un anticuerpo murino (IgG1) que se une a endosialina, y se ha demostrado que reconoce las células endoteliales asociadas a una diversidad de diferentes tipos de cáncer. El estudio estructural ha clasificado la endosialina como una proteína integral de membrana similar a lectina de tipo C compuesta de cinco dominios extracelulares globulares (que incluyen un dominio de lectina de tipo C, un dominio con similitud hacia el patrón Sushi/ccp/scr, y tres repeticiones de EGF). La proteína contiene también una región similar a mucina, un segmento transmembrana, y una cola citoplasmática corta. La proteína parece ser una glicoproteína. El análisis de carbohidratos demuestra que la proteína central de endosialina tiene una abundante glicosilación con unión en O (Christian *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:48588-48595). El trabajo posterior combinó las regiones determinantes de la complementariedad

(CDRs) de FB5 de ratón en un esqueleto de IgG1 humana para crear un anticuerpo humanizado que se une a vasos en los tejidos cancerosos así como a un subgrupo de células en cultivos de HMVEC.

Los ratones con inactivación de *Tem1* se desarrollan normalmente y exhiben una cicatrización normal de heridas, lo que sugiere que la endosialina no es necesaria para la neovascularización durante el desarrollo fetal o la reparación de heridas. (Nanda *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3351-3356). Cuando se implantaron células de cáncer colorrectal en sitios abdominales de ratones con inactivación de *Tem1*, sin embargo, la pérdida de expresión de endosialina se correlacionó con una reducción del crecimiento tumoral, la invasión, y la metástasis en comparación con los animales originarios. Se ha demostrado que la ausencia de expresión de endosialina reduce el crecimiento, la invasión, y la metástasis de xenoinjertos de tumores humanos en un ratón con inactivación de endosialina. (Nanda *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3351-3356). Además, la carencia de endosialina condujo a un incremento de vasos sanguíneos inmaduros pequeños y un número disminuido de vasos tumorales medios y grandes.

La neovascularización está asociada a varios estados patológicos. En el cáncer, se cree que la neovascularización es importante para suministrar sangre a los tumores. En las enfermedades no oncológicas o cancerosas, tales como retinopatía y degeneración macular, la neovascularización incontrolada provoca la pérdida de vista (Wilkinson-Berka (2004) *Curr. Pharm. Des.*, 10:3331-48; Das y McGuire (2003) *Prog. Retin. Eye Res.*, 22:721-48). Además, varios informes han identificado un papel de la neovascularización en la enfermedad inflamatoria (Paleolog y Miotla (1998) *Angiogenesis*, 2(4):295-307). Los métodos para entender las rutas moleculares en las células precursoras y endoteliales similares a las embrionarias, así como las células asociadas endoteliales (pericitos, fibroblastos, etc.) asociadas a estos estados patológicos conducirán al desarrollo de fármacos nuevos para tratar estas enfermedades. A la inversa, la neovascularización está asociada a la cicatrización de heridas (Galiano *et al.* (2004) *Am. J. Pathol.*, 164:1935-47). La identificación de las rutas moleculares que estimulan la vascularización para la cicatrización de heridas puede ofrecer la capacidad de identificar fármacos y factores que pueden estimular estos procesos para potenciar el tratamiento de heridas asociadas a traumatismos, quemaduras e infecciones.

Un problema difícil en la terapia eficaz antiangiogénica y proangiogénica es la naturaleza indefinida de los procesos biológicos, de las moléculas y las rutas asociadas que son importantes para activar los procesos celulares asociados a la neovascularización (Bagley *et al.* (2003) *Cancer Res.*, 63:5866-73). La capacidad de identificar y dilucidar las moléculas y su función en la regulación de una ruta dada puede conducir al aislamiento de compuestos eficaces que tienen actividad estimuladora o inhibidora en las enfermedades asociadas a procesos neovasculares tales como el cáncer, la inflamación, enfermedad ocular, enfermedad cardiovascular, y cicatrización de heridas. La capacidad de aislar y estudiar estos compuestos por medio de ensayos moleculares proporcionaría una utilidad adicional para determinar sus efectos para inhibir o estimular de manera específica la biología normal de las células implicadas en la neovascularización en contraste con las células endoteliales similares a las adultas asociadas a vasos en el tejido adulto normal (Asahara y Kawamoto (2004) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287:C572-9).

35 Sumario

La invención presenta anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos para inhibir la interacción de una célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina.

Los ligandos de endosialina implicados en la presente invención son colágeno o fibronectina. El ligando puede ser colágeno I o colágeno IV. La célula puede ser una célula de mamífero. La regulación de la expresión de endosialina a nivel genético se puede llevar a cabo mediante cualquier medio adecuado en la técnica, tal como una molécula de ácido nucleico inversa, ARN bicatenario, ribozimas, ribozimas en cabeza de martillo, oligonucleótidos señuelo, y similares. La regulación de la expresión de endosialina también se puede llevar a cabo inactivando el gen que codifica la endosialina.

En un aspecto, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos obstruyen físicamente la endosialina expresada en la superficie de una célula que expresa endosialina, por lo que inhiben la interacción de la célula con un ligando de endosialina. Los ligandos de endosialina son colágeno (p.ej., colágeno I o colágeno IV) o fibronectina.

La obstrucción de la endosialina en la superficie celular se puede llevar a cabo mediante cualquier medio adecuado en la técnica, tal como los anticuerpos que se unen de manera específica a endosialina. Se pueden emplear inhibidores competitivos para inhibir la interacción de endosialina o una célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina. Los inhibidores competitivos pueden ser ligandos de endosialina, fragmentos de unión a endosialina de ligandos de endosialina, por ejemplo, fragmentos de unión a endosialina de colágeno o fibronectina. Los inhibidores competitivos preferidos son fragmentos de unión a endosialina de colágeno I, colágeno IV, o fibronectina. Los inhibidores competitivos más preferidos son el fragmento N-terminal de 70 kDa de fibronectina, el fragmento de unión a gelatina de 45 kDa de fibronectina, y el fragmento de unión a heparina de 30 kDa de fibronectina.

Los anticuerpos adecuados pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, fragmentos de unión al antígeno que se unen de manera específica al antígeno, y

similares. En ciertas realizaciones, la afinidad del anticuerpo por el antígeno es preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-7} M, más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-8} M, aún más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-9} M, y lo más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-10} M. En ciertas realizaciones preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo anti-endosialina o un fragmento de unión al antígeno que reconoce de manera específica endosialina. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de SEQ ID N°:28, 30, y 32, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de SEQ ID N°: 13, 15, y 17, respectivamente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una cadena pesada que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 34 y una cadena ligera que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 19. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:22 ó 26 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:11. Los anticuerpos M4 y M4.1 son anticuerpos humanizados hacia endosialina humana. Aunque los anticuerpos M4 y M4.1 comparten una secuencia de la cadena ligera, difieren en su cadena pesada por una secuencia de un único aminoácido mostrada, por ejemplo, en el residuo 429 de SEQ ID N°:20 respecto del residuo 429 de SEQ ID N°:24. El cambio del aminoácido es el resultado de una alteración de un único nucleótido mostrada, por ejemplo, en el nucleótido 1286 de SEQ ID N°: 19 respecto del nucleótido 1286 de SEQ ID N°:23. En ciertas realizaciones, los anticuerpos que se pueden usar de acuerdo con la invención se producen mediante células que tiene el n° de acceso de la ATCC PTA-7554 o n° de acceso de la ATCC PTA-9017.

La inhibición de la interacción de endosialina con los ligandos de endosialina puede afectar a rutas, cascadas, y efectos posteriores provocados por la interacción normal. Por ejemplo, la obstrucción o inhibición de la interacción de una célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina puede inhibir la activación de las integrinas, la activación de las metaloproteasas de la matriz, y/o la expresión de las metaloproteasas de la matriz. Se puede inhibir la motilidad celular. Se inhibe la angiogénesis o la neovascularización.

En ciertas realizaciones, la inhibición de la interacción de la célula que expresa endosialina con su ligando inhibe la activación de las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$, o $\beta 3$. En ciertas realizaciones, la inhibición de la interacción de la célula que expresa endosialina con su ligando inhibe la migración de la célula. En ciertas realizaciones, la inhibición de la interacción de la célula que expresa endosialina con su ligando inhibe la activación o la expresión de una metaloproteasa de la matriz. En las realizaciones preferidas, la metaloproteasa de la matriz es MMP-9.

Los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden estar implicados en la inhibición *in vitro* e *in vivo* de la angiogénesis o la neovascularización. En ciertos aspectos, se puede administrar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une de manera específica a endosialina o una composición que obstruye la endosialina expresada en la superficie de una célula en una composición de forma que se inhibe la interacción de la célula con un ligando de endosialina. Esta inhibición inhibe la angiogénesis y/o la neovascularización de un tejido, órgano, o neoplasia en el sujeto al que se administra la composición. Los ligandos de endosialina pueden ser proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno (p.ej., colágeno I o colágeno IV) o fibronectina. La composición puede comprender cualquier molécula, tal como las descritas y ejemplificadas en la presente memoria, que pueden obstruir físicamente la interacción de endosialina de la superficie celular con al menos un ligando de endosialina. Los ejemplos de tales moléculas incluyen, sin limitación, los inhibidores de moléculas pequeñas, inhibidores polipeptídicos, anticuerpos que se unen de manera específica a endosialina, anticuerpos que se unen de manera específica a un ligando de endosialina, fragmentos de unión al antígeno, y similares. Los anticuerpos adecuados pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, fragmentos de anticuerpos, y similares.

Se pueden identificar los agentes que aumentan ("agonistas") o reducen ("antagonistas") la interacción de endosialina con un ligando de endosialina mediante diversos métodos, que pueden comprender poner en contacto endosialina con un compuesto de ensayo, por lo que se forma un complejo endosialina-compuesto de ensayo, poner en contacto el complejo endosialina-compuesto de ensayo con un ligando de endosialina, y medir de manera cuantificable la interacción de endosialina con el ligando en presencia y ausencia del compuesto de ensayo, en el que una disminución del nivel de interacción de endosialina con el ligando en presencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un antagonista de la interacción de endosialina con el ligando. Los métodos para identificar los agonistas o antagonistas de la interacción de endosialina con un ligando de endosialina comprenden poner en contacto endosialina con un ligando de endosialina en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo y medir de manera cuantificable la interacción de endosialina con el ligando, en los que un incremento o una disminución del nivel de interacción de endosialina con el ligando en presencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un agonista o antagonista, respectivamente, de la interacción de endosialina con el ligando. La endosialina puede estar unida a una membrana celular, un fragmento de membrana celular, una bicapa lipídica artificial, o un soporte sólido. El ligando puede estar unido a un soporte sólido. Los ligandos de endosialina pueden ser proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno o fibronectina.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B muestran análisis inmunohistoquímicos de células positivas para endosialina de tejido canceroso. Se aislaron tumores de pacientes con cáncer colorrectal y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Se realizaron cortes finos de las muestras y se tiñeron con anticuerpo anti-endosialina o de control de

isotipo. Como se muestra, los vasos del tumor (Figura 1A) se tiñeron positivamente para endosialina mientras el corte en serie teñido con el anticuerpo de control de isotipo fue negativo (Figura 1B).

Las Figuras 2A y 2B muestran análisis inmunohistoquímicos de células positivas para endosialina de tejido normal. Se aislaron tejidos normales de pacientes mediante biopsia y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Se realizaron cortes finos de las muestras y se tiñeron con anticuerpo anti-endosialina o de control de isotipo. Como se muestra, el tejido normal contuvo pocas EPCs (flecha, Figura 2A) mientras los cortes en serie teñidos con el anticuerpo de control de isotipo fueron negativos (Figura 2B). Muchos tejidos normales ensayados tuvieron pocas EPCs tal como se determinó mediante tinción *in situ* o con anticuerpo.

La Figura 3 muestra el aislamiento de células positivas para endosialina de cultivos endoteliales primarios. Los cultivos de HMVEC se enriquecieron en EPCs mediante cribado. Los cultivos cribados por endosialina se compararon después con los cultivos originarios de HMVEC en cuanto al porcentaje de células que expresaban endosialina. Como se muestra, el cultivo cribado tuvo un número mucho mayor de células positivas para endosialina en comparación con el cultivo originario sin cribar, tal como se determina mediante inmunotinción por medio de un anticuerpo anti-endosialina seguido de un anticuerpo secundario conjugado fluorescente. El número de células de cada campo se determinó mediante microscopía óptica.

La Figura 4 muestra que la endosialina recombinante (Fc-TEM1) se une a las proteínas de la matriz extracelular (EMPs). Las placas de ELISA, prerrevestidas con las EMP fibronectina (FN), colágeno (COL; que incluye colágeno de tipo I (COL I) y colágeno de tipo IV (COL IV)), vitronectina (VN), laminina (LN), o gelatina (Gel), se bloquearon con tampón de ensayo de ELISA antes de la adición de la proteína purificada Fc-TEM1 a concentraciones crecientes. Después de una incubación de dos horas, las placas se lavaron y se ensayó la unión mediante el uso de un mAb secundario anti-ratón de cabra unido a HRP específico de la cola de Fc mediante el uso de las condiciones habituales de ELISA. Las placas se lavaron y se revelaron, y después se ensayaron mediante el uso de un lector de placas a una DO de 450 nm. Como se muestra en la Figura 4A, el Fc-TEM1 se unió fuertemente a FN y COL, a la vez que se observó una unión débil con LM, VN, o Gel. Para la Figura 4B, se pre-revistió una placa de ELISA durante la noche con los antígenos siguientes: enterotoxina B de *Staphylococcus* (STEB), ovalbúmina (OVA), gamma globulina bovina (BGG), antígeno de glicoproteína de 90 kDa asociado a tumores expresado en la mayoría de las células de melanoma (TA90), lisozima de huevo de gallina (HEL), toxoide tetánico (TT), 1% de BSA, mesotelina humana, GM-CSF humana, IgG de cabra, e IgG de ratón. Fc-TEM1 se añadió en cantidades crecientes (5, 10, 50 ug/ml) y se dejó adherir durante 2 horas. Las placas se lavaron después y se añadió anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado a HRP para detectar el Fc-TEM1 unido.

La Figura 5 muestra la cartografía de los dominios de unión de fibronectina (FN) a endosialina. Los fragmentos proteolíticos y recombinantes derivados de fibronectina (FN) se estudiaron en cuanto a la capacidad de mantener la unión de TEM-1. Los fragmentos de FN estudiados incluyen: el fragmento N-terminal de 70 kDa (Cat. de Sigma N° F0287) (obtenido mediante la digestión con cathepsina D de fibronectina); el fragmento de unión a heparina de 30 kDa (Cat. de Sigma N° F9911); el fragmento de unión a gelatina de 45 kDa (Cat. de Sigma N° F0162) (ambos obtenidos de la digestión con tripsina del fragmento de 70 kDa); el fragmento de 120 kDa que contiene el dominio de unión a células ("el fragmento de 120 kDa"); y dos fragmentos recombinantes: Fn2, que contiene los primeros 7 dominios de FN de tipo III, y Fn4, que contiene el sitio de enlaces disulfuro intercatenarios y el dominio de unión a integrina $\alpha 4 \beta 1$. El diagrama de la estructura de FN se adaptó de Wierzbicka-Patynowski *et al.* (2003) *J. Cell Sci.*, 116:3269-76.

La Figura 6 muestra la unión de Fc-TEM1 recombinante a EMP y fibronectina en presencia de inhibidores. M4 es un anticuerpo humanizado hacia endosialina humana, mientras rbtTEM1 es un anticuerpo de conejo hacia endosialina humana. El ensayo se llevó a cabo como se describió en la Figura 4, excepto porque se añadieron anticuerpos para medir la capacidad de alterar o bloquear la unión de Fc-TEM1 a FN. Como se muestra en esta figura, M4 fue capaz de inhibir la unión de Fc-TEM1 a FN, mientras un control inespecífico (HulG) no lo hizo.

La Figura 7 muestra la unión de endosialina a fragmentos de EMP y la inhibición de la misma mediante compuestos inhibidores de endosialina-EMP. Los fragmentos de fibronectina se ilustran en la Figura 5. La Figura 7A muestra la unión a fragmentos de proteína derivados de FN nativo. La Figura 7B muestra la unión a fragmentos de proteína derivados de FN desnaturalizado. Para las Figuras 7A y 7B, el fragmento de FN se revistió en una placa de ELISA a las concentraciones indicadas. Se usó un anticuerpo policlonal anti-FN seguido de la adición de anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado a HRP para detectar las proteínas unidas intactas. Se añadió Fc-TEM1 (1,25 ug/ml) y se dejó unirse durante 2 horas. Las placas se lavaron después y se añadió anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado a HRP para detectar el Fc-TEM1 unido. La barra sombreada (Fc-TEM1-nativo) de la Figura 7B representa la unión de Fc-TEM1 a FN sin desnaturalizar. Como se muestra, la endosialina se une a la región N-terminal de fibronectina, ya que se detectó poca o ninguna unión para la unión a los fragmentos FN-2, FN-4, o 120 kDa. Los anticuerpos policlonales hacia fibronectina se unieron a todos los fragmentos. Las Figuras 7C y 7D muestran la unión de Fc-TEM1 al fragmento de 70 kDa de FN y la inhibición de la interacción mediante los compuestos inhibidores de endosialina-EMP. Se revistió FN completo y la proteína de FN de 70 kDa en una placa de ELISA a una concentración fija de ~15 nmol/pocillo para ambas proteínas. Fc-TEM1 (1,25 ug/ml) se preincubó a 4°C durante 1 hora con cantidades crecientes de anticuerpo M4 anti-endosialina o IgG de control de isotipo. Los complejos Fc-TEM1/M4 (Figura 7C) o Fc-TEM1/IgG (Figura 7D) se añadieron a pocillos revestidos con FN y 70 kDa

y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La proteína Fc-TEM1 unida se detectó mediante la adición de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado a HRP.

La Figura 8 ilustra un cambio en la morfología celular en una mezcla de proteína gelatinosa comercializada con el nombre comercial MATRIGEL (BD Biosciences) tras la expresión de endosialina. Se sembraron 8E4 células CHO-K1 o CHO-TEM1 en una placa de 96 pocillos revestidos con MATRIGEL y se incubaron a 37°C. Tras la incubación durante la noche, las células se fotografiaron para el examen macroscópico de la formación de túbulos.

La Figura 9 muestra la unión celular mediada por endosialina a fragmentos de EMP. Se transfectaron células CHO con un vector que expresaba endosialina o cADN simulado. Se confirmó que las células expresaban endosialina en la superficie celular (CHOTEM1) mientras las transfectadas con la molécula simulada (CHOK1) no la expresaban. Para la Figura 9A, se añadieron células de ovario de hámster chino (CHO) a una placa de 96 pocillos pre-revestidos que contenían diversas proteínas de ECM. Las células se dejaron adherir durante 1 hora a 37°C y los pocillos se lavaron exhaustivamente para eliminar cualquier célula unida débilmente. Se determinó el número de células unidas mediante el uso del Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CELLTITER-GLO. Abreviaturas: Col, Colágeno; FN, fibronectina; LN, laminina; TN, tenascina; VN, vitronectina; Neg, albúmina de suero bovino. Para la Figura 9B, se transfectaron células de ovario de hámster chino (CHO) con un vector que expresaba endosialina o cADN simulado. Se confirmó mediante análisis FACS que las células expresaban endosialina en la superficie celular (CHOTEM1) mientras las transfectadas con la molécula simulada (CHOK1) no la expresaban. Después las células se ensayaron con respecto a la capacidad de unirse a la EMP fibronectina sola o en combinación con el anticuerpo M4 anti-endosialina o IgG de control. La Figura 9B muestra que el anticuerpo M4 anti-endosialina reduce la adhesión celular mediada por endosialina a FN. Las células (1,5E5) se preincubaron durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo M4 (100 ug/ml) o un anticuerpo de control de isotipo IgG (100 ug/ml). Para la Figura 9C, las células se ensayaron con respecto a la capacidad de unirse a FN de tamaño completo o fragmentos de fibronectina. Como se muestra en la Figura 9A, el número de células CHO-TEM1 adherentes fue 6 veces mayor que el número de células CHO-K1 originarias en los pocillos revestidos con FN. No se observaron diferencias significativas en la adhesión entre CHO-K1 y CHO-TEM1 en las superficies revestidas con laminina o vitronectina, mientras la adhesión a colágenos y tenascina fue demasiado débil para calcular ninguna diferencia valiosa (Figura 9A). El pretratamiento de las células CHO-TEM1 con el anticuerpo M4 dio como resultado una reducción del 50% de la adhesión celular dependiente de TEM1-FN, mientras el anticuerpo de control de IgG no tuvo ningún efecto (Figura 9B). El tratamiento con el anticuerpo M4 no afectó a la adhesión celular dependiente de FN, independiente de endosialina (adhesión inicial) de las células CHO-K1 originarias. Las células CHO-TEM1 mostraron una adhesión incrementada de 3 a 5 veces a FN, fragmentos de 70 kDa, y 30 kDa en comparación con las células CHO-K1 originarias, mientras no se observó una adhesión significativa a fragmentos de 45 kDa o Fn2. Las células CHO-TEM1 se unieron a MATRIGEL cinco veces mejor que CHO-K1 (Figura 9C).

La Figura 10 muestra la identificación de compuestos inhibidores de endosialina-EMP colágeno. Se transfectaron células CHO con un vector que expresaba endosialina o cADN simulado. Se confirmó que las células expresaban endosialina en la superficie celular (CHOTEM1) mientras las transfectadas con la molécula simulada (CHOK1) no la expresaban. Después las células se ensayaron con respecto a la capacidad de unirse a la EMP Colágeno de Tipo I (COL I) solo o en combinación con el anticuerpo M4 anti-endosialina o IgG de control. Como se muestra, la sobre-expresión de endosialina da como resultado una unión celular incrementada a COL I, que se puede bloquear mediante inhibidores de endosialina tales como M4, en contraste con la molécula de control (IgG). RbtTEM1 también inhibió la unión de Fc-TEM1 a COL I (datos no mostrados).

La Figura 11 muestra la unión celular mediada por endosialina a EMP colágeno. Se transfectaron células CHO con un vector que expresaba endosialina o cADN simulado. Se confirmó que las células expresaban endosialina en la superficie celular (CHOTEM1) mientras las transfectadas con la molécula simulada (CHOK1) no la expresaban. Después se ensayaron las células con respecto a la capacidad de unirse a EMP colágeno de tipo I. Como se muestra, la sobre-expresión de endosialina da como resultado una unión celular incrementada a COL I.

La Figura 12 muestra la mediación de la migración celular por endosialina y la inhibición de la misma mediante el anticuerpo M4 anti-endosialina. Se determinó la capacidad de M4 de inhibir la migración de las células CHO-TEM1 y CHO-K1 a través de membranas revestidas de MATRIGEL (Figura 12A) o FN (Figura 12B). Las células se añadieron a la cámara superior y se dejaron migrar durante 48 horas a 37°C. La membrana se eliminó, y se determinó el número de células migradas mediante el uso del Ensayo de Viabilidad Celular mediante Luminiscencia CELLTITER-GLO. Donde se indica, las células se trataron con M4 o control de isotipo IgG durante el experimento. Como se muestra en la Figura 12A, las células CHO-K1 exhibieron una migración celular moderada, mientras las células CHO-TEM1 mostraron una migración incrementada >10 veces. El tratamiento con el anticuerpo M4, pero no con la IgG de control, eliminó la migración de las células CHO-TEM1. Se observaron resultados similares en los experimentos de migración mediante el uso de cámaras Transwell revestidas con FN (Figura 12B).

La Figura 13 muestra el incremento mediante endosialina de las rutas celulares. Se transfectaron células CHO con un vector que expresaba endosialina o cADN simulado. Se confirmó que las células expresaban endosialina en la superficie celular (CHOTEM1) mientras las transfectadas con la molécula simulada (CHOK1) no la expresaban. Después se ensayaron las células con respecto a la capacidad de estimular las rutas celulares. Una de dichas rutas es la ruta de MMP9, que desempeña un papel en la migración celular. Como se muestra, la sobre-expresión de

endosialina da como resultado una actividad incrementada de MMP-9 en contraste con las células de control.

La Figura 14 muestra el efecto del bloqueo de endosialina sobre la activación de β integrina. Se transfectaron células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) con un vector que expresaba endosialina o un cADN simulado. Se confirmó que las células expresaban endosialina en la superficie celular (293TEM1), mientras las transfectadas con la molécula simulada (293T) no la expresaban. Después se ensayaron las células con respecto a la capacidad de estimular las rutas celulares. Una de dichas rutas es la ruta de integrinas, que desempeña un papel en la migración celular. Como se muestra, la sobre-expresión de endosialina da como resultado una actividad incrementada de integrina β 1 (Figura 14B) en contraste con las células de control, mientras el efecto directo sobre la expresión de β 1 en la superficie celular no cambia (Figura 14A). El tratamiento de las células con el inhibidor de endosialina M4 dio como resultado una actividad inhibida de integrinas, mientras no se observó ningún efecto sobre los niveles de la superficie celular (Figura 14B). Estos datos demuestran la capacidad de usar inhibidores de endosialina para inhibir la función de las integrinas en las células que expresan endosialina.

La Figura 15 ilustra que el anticuerpo M4.1 reconoce TEM-1 humano sin reducir en células CHO-TEM-1 y pericitos primarios humanos, pero no TEM-1 murino en células 2H11 de ratón. El anticuerpo policlonal de conejo hacia TEM-1 humano (rabPAb TEM-1) reconoce TEM-1 humano en células CHO-TEM-1 y pericitos humanos, pero también TEM-1 murino en células 2H11 de ratón. Ni M4.1 ni rabPAb TEM-1 reaccionaron hacia los lisados de células CHO-K1 originarias o células NS0 y MS1 de ratón debido a la ausencia de expresión de TEM-1 en estas células. Solamente rabPAb TEM-1 reaccionó con TEM-1 humano reducido, aunque en menor grado en comparación con TEM-1 sin reducir.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

Se usan diversos términos relacionados con los métodos y otros aspectos de la presente invención a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones. A tales términos se les debe dar su significado habitual en la técnica a menos que se indique de otra manera. Otros términos definidos de manera específica se deben considerar de manera coherente con la definición proporcionada en la presente memoria.

Se debe entender que esta invención no se limita a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que por supuesto pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitante.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/una", "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contenido lo dicte claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

Cada intervalo enumerado en la presente memoria incluye todas las combinaciones y sub-combinaciones de intervalos, así como los números específicos contenidos en ellos.

El término "alrededor de", tal como se usa en la presente memoria cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, aún más preferiblemente $\pm 1\%$, y todavía más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son adecuadas para llevar a cabo los métodos descritos.

"Ensayo específico de endosialina" (ESA) se refiere a los ensayos que se pueden usar para identificar los compuestos que pueden alterar directamente o indirectamente la expresión o la actividad biológica de endosialina, lo que da como resultado una unión directa o indirecta modificada de las células que expresan endosialina o endosialina a EMPs por medio de endosialina o mecanismos mediados por integrinas, así como modificar rutas endógenas celulares tales como, pero sin limitación, metaloproteasas de la matriz (MMPs) y/o la proliferación o supervivencia celular.

"Polinucleótido", denominado de forma sinónima "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Los "polinucleótidos" incluyen, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más generalmente, bicatenarias o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, "polinucleótido" se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido incluye además ADNs o ARNs que contienen una o más bases modificadas y ADNs o ARNs con esqueletos modificados por estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco habituales tales como inosina. Se puede hacer una diversidad de modificaciones en el ADN y ARN; así, "polinucleótido" abarca las formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente de polinucleótidos tal como se hallan en general en la naturaleza, así como las formas químicas del ADN y ARN características de virus y células. "Polinucleótido" también abarca cadenas de ácido nucleico relativamente cortas, a menudo denominadas oligonucleótidos.

Un "vector" es un replicón, tal como plásmido, fago, cósmido, o virus al que se le puede insertar de manera operable

otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación o expresión del segmento.

"Polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son una molécula mimética química artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos que se dan de manera natural y polímeros de aminoácidos que no se dan de manera natural. Los polipéptidos de la invención incluyen las variantes modificadas de manera conservativa. Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservativa" en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen muy bien en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservativa son adicionales, y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos interespecie, y alelos de la invención.

El término "expresar", "expresado", o "expresión" de una molécula de ácido nucleico se refiere a la biosíntesis de un producto de un gen. El término abarca la transcripción de un gen hasta ARN. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un gen regulador tal como un ácido nucleico inverso o un ácido nucleico de interferencia se puede expresar mediante transcripción en forma de ARN inverso o ARNi o shARN. El término también abarca la traducción de ARN hasta uno o más polipéptidos, y abarca todas las modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales que se dan de manera natural.

Una célula se ha "transformado" o "transfectado" mediante ácidos nucleicos exógenos o heterólogos tales como ADN cuando se ha introducido tal ADN dentro de la célula. El ADN transformante se puede integrar o no (unido de manera covalente) en el genoma de la célula. En los procariotas, células de levadura, y de mamífero, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener en un elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula transformada de manera estable, o "célula estable", es una en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma de forma que es heredado por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra mediante la capacidad de la célula eucariótica de establecer líneas celulares o clones compuestos de una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células procedentes de una única célula o progenitor común mediante mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de tener un crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Tal como se usa en la presente memoria, un "compuesto de ensayo" se refiere a cualquier molécula purificada, molécula sustancialmente purificada, moléculas que son uno o más componentes de una mezcla de compuestos, o una mezcla de un compuesto con cualquier otro material que se puede utilizar según la presente invención. Los compuestos de ensayo pueden ser productos químicos orgánicos o inorgánicos, o biomoléculas, y todos los fragmentos, análogos, homólogos, conjugados, y derivados de los mismos. Las "biomoléculas" incluyen proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, monosacáridos, polisacáridos, y todos los fragmentos, análogos, homólogos, conjugados, y derivados de los mismos. Los compuestos de ensayo pueden ser de origen natural o sintético, y se pueden aislar o purificar de sus fuentes naturales, o se pueden sintetizar *de novo*. Los compuestos de ensayo se pueden definir en cuanto a la estructura o composición, o pueden ser indefinidos. El compuesto puede ser un producto aislado de estructura desconocida, una mezcla de varios productos conocidos, o una composición indefinida que comprende uno o más compuestos. Los ejemplos de composiciones indefinidas incluyen extractos de células y tejidos, medio de crecimiento en el que se han cultivado células procarióticas, eucarióticas, y arqueobacterias, caldos de fermentación, bibliotecas de expresión de proteínas, y similares.

"Inactivado" se refiere a una célula u organismo que tiene una expresión reducida de uno o más genes. Como apreciarán los expertos en la técnica, una inactivación exhibirá una reducción de la expresión de al menos alrededor de un 50%, preferiblemente exhibirá una reducción de la expresión de al menos alrededor de un 67%, y más preferiblemente exhibirá una reducción de la expresión de al menos alrededor de un 75%, aunque son posibles reducciones mayores, que incluyen una reducción de la expresión de al menos alrededor de un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más.

"Inhibir" o "inhibición" o "interferir" significa reducir, disminuir, bloquear, prevenir, retrasar, reprimir, inactivar, desensibilizar, detener, o reducir la actividad biológica o la expresión de un gen, producto génico (p.ej., polipéptido), o ruta de interés.

La inhibición de la expresión o actividad biológica de una proteína o ruta de interés, por ejemplo, endosialina o ruta de migración celular, se refiere a una disminución (inhibición o reducción) mayor de alrededor del 50% a alrededor del 99%, y de manera más específica, alrededor del 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más. La inhibición puede ser directa, es decir, ejercida sobre la molécula o ruta de interés propiamente dicha, o indirecta, es decir, ejercida sobre una molécula o ruta que afecta a la molécula o ruta de interés.

- 5 "Recombinante", cuando se usa con referencia, p.ej., a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula procede de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se hallan en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que se expresan por otra parte de manera anormal, que se expresan en menor medida o que no se expresan en absoluto.
- 10 "Cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan de manera intercambiable en la presente memoria, y se refieren a una cantidad de un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, o composición, tal como se describe en la presente memoria, eficaz para llevar a cabo un resultado biológico particular tal como, pero sin limitación, resultados biológicos revelados, descritos, o ejemplificados en la presente memoria. Tales resultados pueden incluir, pero sin limitación, el tratamiento de una enfermedad asociada a la angiogénesis o la neovascularización, tal como se determina mediante cualquier medio adecuado en la técnica.
- Tal como se usa en la presente memoria, "medir" o "determinar" se refiere a cualquier determinación cualitativa o cuantitativa.
- 15 "Ligando de endosialina" se refiere a cualquier producto químico, biomolécula, complejo, o análogo, homólogo, o derivado de los mismos que se puede unir a, interaccionar con, estimular, y/o alterar la expresión de la endosialina.
- 20 Excepto cuando se indique, "sujeto" o "paciente" se usan de manera intercambiable y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales experimentales tales como conejos, perros, gatos, ratas, ratones, y otros animales. Por lo tanto, "sujeto" o "paciente", tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier paciente o sujeto mamífero al que se pueden administrar las composiciones de la invención.
- "Angiogénesis" se refiere a la formación de vasos sanguíneos nuevos.
- "Neovascularización" se refiere a una proliferación patológica de vasos sanguíneos nuevos en tejido(s) u órgano(s) que normalmente no contiene(n) vasos sanguíneos, o una proliferación patológica de vasos sanguíneos de un tipo o cantidad diferente de la normal para un tejido u órgano particular.
- 25 "Epítopo" se refiere a un determinante inmunológico de un antígeno que sirve como sitio de unión al anticuerpo. Tal como se usa en la presente memoria, el término "epítopo conformacional" se refiere a un epítopo discontinuo formado por una relación espacial entre aminoácidos de un antígeno distinto de una serie ininterrumpida de aminoácidos.
- 30 "Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" del estado natural. Si una molécula o composición se da en la naturaleza, ha sido "aislada" si se ha cambiado o extraído de su medio original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de manera natural en una planta o animal vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado" tal como se emplea el término en la presente memoria.
- 35 "Sustancialmente el mismo", con respecto al ácido nucleico o a las secuencias de aminoácidos, significa al menos alrededor del 65% de identidad entre dos o más secuencias. Preferiblemente, el término se refiere a al menos alrededor del 70% de identidad entre dos o más secuencias, más preferiblemente al menos alrededor del 75% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 80% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 85% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 90% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 91% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 92% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 93% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 94% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 95% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 96% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 97% de identidad, más preferiblemente al menos alrededor del 98% de identidad, y más preferiblemente al menos alrededor del 99% o más identidad.
- 40
- 45 Se ha descubierto de acuerdo con la presente invención que la endosialina interacciona de manera específica con las proteínas de la matriz extracelular fibronectina o colágeno. También se ha descubierto que esta interacción estimula la migración celular y además estimula y facilita la angiogénesis. Además de estas observaciones, se ha descubierto que la alteración de la interacción entre la endosialina y las proteínas de la matriz extracelular puede inhibir la migración celular y puede inhibir la angiogénesis. Por lo tanto, la invención presenta anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos para inhibir la interacción de endosialina con los ligandos de endosialina.
- 50
- 55 En un aspecto, la invención presenta anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos para inhibir la interacción de la endosialina expresada por una célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina. También se puede inhibir la expresión de endosialina por la célula. La inhibición de la expresión de endosialina se puede dar a nivel del gen o a nivel de la proteína. Por ejemplo, la inhibición de la expresión de endosialina puede comprender seleccionar como objetivo el ADN que codifica endosialina, o seleccionar como objetivo el transcrito de mRNA del gen de endosialina.

Se conocen los métodos de regulación génica y se ponen en práctica fácilmente en la técnica. Por ejemplo, en células modificadas de manera específica para expresar un transgén que codifica endosialina (p.ej., SEQ ID N°:1, 3, o 5), el transgén se puede colocar bajo control de un promotor inducible. Los expertos en la técnica conocerán los promotores inducibles adecuados para el uso en este método.

5 Los genes que codifican endosialina se pueden inhibir por medio del uso de una diversidad de otras técnicas de silenciamiento génico post-transcripcional (silenciamiento del ARN). El silenciamiento del ARN implica el procesamiento del ARN bicatenario (dsARN) hasta fragmentos pequeños de 21-28 nucleótidos mediante una enzima basada en la RNasa H ("Dicer" o "similar a Dicer"). Los productos de escisión, que son siARN (ARN pequeño de interferencia) o miARN (micro-ARN) se incorporan en complejos efectores de proteínas que regulan la expresión
10 génica de una manera específica de secuencia.

La interferencia de ARN (ARNi) es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional mediado por ARN bicatenario (dsARN), que es diferente de las aproximaciones basadas en moléculas inversas y basadas en ribozimas (véase Jain, *Pharmacogenomics* (2004) 5:239-42, para una revisión del ARNi y siARN). La interferencia de ARN es útil en un método para inhibir la expresión de endosialina en una célula o en un animal tal como un ser humano transformando la célula o administrando al animal un ácido nucleico (p.ej., dsARN) que se hibrida en condiciones rigurosas con un gen que codifica endosialina, y atenúa la expresión del gen seleccionado como objetivo. La interferencia de ARN proporciona shARN o siARN que comprenden múltiples secuencias que seleccionan como objetivo una o más regiones del gen de endosialina. Se cree que las moléculas de ARN bicatenario (dsARN) (shARN o siARN) dirigen la degradación específica de secuencia del mRNA en células de diversos tipos después de haber experimentado primero un procesamiento por una enzima similar a RNasa III denominada DICER (Bernstein E *et al.* (2001) *Nature* 409:363-366) hasta moléculas de dsARN más pequeñas compuestas de dos cadenas de 21 nt, cada una de las cuales tiene un grupo fosfato en 5' y un hidroxilo en 3', e incluye una región de 19 nt exactamente complementaria a la otra cadena, de forma que existe una región doble de 19 nt flanqueada por salientes en 3' de 2
15 nt. El ARNi está así mediado por ARNs cortos de interferencia (siARN), que comprenden en general una región bicatenaria de una longitud de aproximadamente 19 nucleótidos con salientes en 3' de 1-2 nucleótidos en cada cadena, lo que da como resultado una longitud total de entre aproximadamente 21 y 23 nucleótidos. En las células de mamífero, el dsARN más largo de aproximadamente 30 nucleótidos induce en general la degradación inespecífica del mRNA por medio de la respuesta al interferón. Sin embargo, la presencia de siARN en las células de mamífero, en vez de inducir la respuesta al interferón, da como resultado el silenciamiento del gen específico de la
20 secuencia.

Los vectores virales o los vectores de ADN codifican ARN corto en horquilla (shARN), que se procesan en el citoplasma celular hasta ARN corto de interferencia (siARN). En general, un ARN corto de interferencia (siARN) comprende un ARN doble que preferiblemente tiene una longitud de aproximadamente 19 pares de bases y opcionalmente comprende además uno o dos salientes o giros monocatenarios. Un siARN puede comprender dos cadenas de ARN hibridadas entre sí, o puede comprender de manera alternativa una única cadena de ARN que incluye una porción de autohibridación. Los siARNs pueden incluir uno o más extremos de cadenas libres, que pueden incluir grupos fosfato y/o hidroxilo. Los siARNs incluyen en general una porción que hibrida en condiciones rigurosas con un transcrito seleccionado como objetivo. Una cadena del siARN (o la porción de autohibridación del siARN) en general es exactamente complementaria a una región del transcrito seleccionado como objetivo, lo que significa que el siARN hibrida con el transcrito seleccionado como objetivo sin un solo emparejamiento incorrecto. Cuando no se alcanza una complementariedad perfecta, en general se prefiere que cualquier emparejamiento incorrecto esté localizado en o cerca de los extremos del siARN.
35

Se ha demostrado que los siARNs inhiben la expresión génica cuando se transfieren a células de mamífero mediante métodos tales como la transfección, electroporación, transfección mediada por liposomas catiónicos, o microinyección, o cuando se expresan en células por medio de cualquiera de una diversidad de aproximaciones basadas en plásmidos. La interferencia de ARN mediante el uso de siARN se revisa, p.ej., en Tuschl (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:446-8; Yu J-Y *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:6047-52; Sui G *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:5515-20; Paddison *et al.* (2002) *Genes and Dev.*, 16:948-58; Brummelkamp *et al.* (2002) *Science*, 296:550-3, 2002; Miyagashi *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:497-500; y Paul *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:505-8. Como se describe en estas y otras referencias, el siARN puede consistir en dos cadenas de ácido nucleico individuales o en una única cadena con una región autocomplementaria capaz de formar una estructura de horquilla (tallo-giro). Diversas variaciones en la estructura, longitud, número de emparejamientos incorrectos, tamaño del giro, identidad de los nucleótidos en los salientes, etc., son coherentes con un silenciamiento génico eficaz desencadenado por el siARN. Aunque no se desea limitarse por ninguna teoría, se cree que el procesamiento intracelular (p.ej., mediante DICER) de una diversidad de precursores diferentes da como resultado la producción de siARN capaz de mediar de manera eficaz en el silenciamiento génico. En general se prefiere seleccionar como objetivo exones en vez de intrones, y también puede ser preferible seleccionar secuencias complementarias a regiones dentro de la porción de 3' del transcrito seleccionado como objetivo. En general se prefiere seleccionar secuencias que contienen aproximadamente una proporción equimolar de los diferentes nucleótidos y evitar los tramos en los que se repite un único residuo varias veces.
45
50
55
60

Los siARNs pueden comprender así moléculas de ARN que tienen una región bicatenaria de una longitud de aproximadamente 19 nucleótidos con salientes en 3' de 1-2 nucleótidos en cada cadena, lo que da como resultado

una longitud total de entre aproximadamente 21 y 23 nucleótidos. Tal como se usa en la presente memoria, los siARNs también incluyen diversas estructuras de ARN que se pueden procesar *in vivo* para generar tales moléculas. Tales estructuras incluyen cadenas de ARN que contienen dos elementos complementarios que hibridan con otros para formar un tallo, un bucle, y opcionalmente un saliente, preferiblemente un saliente en 3'. Preferiblemente, el tallo tiene una longitud de aproximadamente 19 pb, el bucle tiene una longitud de alrededor de 1-20, más preferiblemente alrededor de 4-10, y lo más preferiblemente alrededor de 6-8 nt y/o el saliente tiene una longitud de alrededor de 1-20, y más preferiblemente alrededor de 2-15 nt. El tallo tiene una longitud de como mínimo 19 nucleótidos y puede tener una longitud de hasta aproximadamente 29 nucleótidos. Los bucles de 4 nucleótidos o más tienen una probabilidad menor de estar sometidos a limitaciones estéricas que los bucles más cortos, y por lo tanto se pueden preferir. El saliente puede incluir un fosfato en 5' y un hidroxilo en 3'. El saliente puede, pero no necesita, comprender una diversidad de residuos de U, p.ej., entre 1 y 5 residuos de U. Los siARNs clásicos como se describieron anteriormente desencadenan la degradación de los mARNs a los que seleccionan como objetivo, por lo que también reducen la velocidad de síntesis de proteínas. Además de los siARNs que actúan por medio de la ruta clásica, ciertos siARNs que se unen a la UTR de 3' de un transcrito molde pueden inhibir la expresión de una proteína codificada por el transcrito molde mediante un mecanismo relacionado pero diferente de la interferencia de ARN clásica, p.ej., reduciendo la traducción del transcrito en vez de disminuir su estabilidad. Tales ARNs se denominan microARNs (miARNs) y tienen en general una longitud de entre aproximadamente 20 y 26 nucleótidos, p.ej., una longitud de 22 nt. Se cree que proceden de precursores mayores conocidos como ARNs temporales pequeños (stARNs) o precursores de mARN, que tienen en general una longitud de aproximadamente 70 nt con un bucle de aproximadamente 4-15 nt (Grishok *et al.* (2001) *Cell*, 106:23-4; Hutvagner *et al.* (2001) *Science*, 293:834-8; Kitting *et al.* (2001) *Genes Dev.*, 15:2654-9). Se han identificado ARNs endógenos de este tipo en varios organismos que incluyen mamíferos, lo que sugiere que este mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional puede estar muy extendido (Lagos-Quintana *et al.* (2001) *Science*, 294:853-8, 2001; Pasquinelli (2002) *Trends Gen.*, 18:171-3). Se ha demostrado que los microARNs bloquean la traducción de los transcritos seleccionados como objetivo que contienen sitios seleccionados como objetivo en células de mamífero (Zeng *et al.* (2002) *Mol. Cell*, 9:1327-33).

Los siARNs tales como los mARNs naturales o artificiales (es decir, diseñados por seres humanos) que se unen en la UTR de 3' (o en otra parte en un transcrito seleccionado como objetivo) y que inhiben la traducción pueden tolerar un número mayor de emparejamientos incorrectos en la molécula doble siARN/molde, y en particular pueden tolerar emparejamientos incorrectos en la región central de la molécula doble. De hecho, existen pruebas de que ciertos emparejamientos incorrectos pueden ser deseables o necesarios, ya que los stARNs que se dan de manera natural exhiben con frecuencia tales emparejamientos incorrectos al igual que los mARNs que se ha demostrado que inhiben la traducción *in vitro*. Por ejemplo, cuando hibridan con el transcrito seleccionado como objetivo, tales siARNs incluyen con frecuencia dos tramos de complementariedad perfecta separados por una región de emparejamientos incorrectos. Es posible una diversidad de estructuras. Por ejemplo, el mARN puede incluir múltiples áreas de ausencia de identidad (emparejamientos incorrectos). Las áreas de ausencia de identidad (emparejamientos incorrectos) no necesitan ser simétricas ya que tanto el objetivo como el mARN incluyen nucleótidos sin emparejar. En general, los tramos de complementariedad perfecta tienen una longitud de al menos 5 nucleótidos, p.ej., una longitud de 6, 7, o más nucleótidos, aunque las regiones de emparejamientos incorrectos pueden tener, por ejemplo, una longitud de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos.

Las estructuras en horquilla diseñadas para imitar los siARNs y los precursores de mARN se procesan de manera intracelular hasta moléculas capaces de reducir o inhibir la expresión de los transcritos seleccionados como objetivo (McManus *et al.* (2002) *RNA* 8:842-50). Estas estructuras en horquilla, que se basan en siARNs clásicos que consisten en dos cadenas de ARN que forman una estructura doble de 19 pb se clasifican como horquillas de clase I o clase II. Las horquillas de clase I incorporan un bucle en el extremo 5' o 3' de la cadena de siARN inversa (es decir, la cadena complementaria al transcrito seleccionado como objetivo cuya inhibición se desea), pero son por otra parte idénticas a los siARNs clásicos. Las horquillas de clase II se parecen a los precursores de mARN ya que incluyen una región doble de 19 nt y un bucle en el extremo 3' o 5' de la cadena inversa de la molécula doble además de uno o más emparejamientos incorrectos de nucleótidos en el tallo. Estas moléculas se procesan de manera intracelular hasta estructuras dobles de ARN pequeño capaces de mediar en el silenciamiento. Parecen ejercer su efecto a través de la degradación del mARN seleccionado como objetivo en vez de a través de la inhibición traduccional, tal como se cree que es el caso para los mARNs y siARNs naturales.

Así, es evidente que un grupo diverso de moléculas de ARN que contienen estructuras dobles es capaz de mediar en el silenciamiento por medio de diversos mecanismos. Cualquier ARN similar, una porción del cual se une a un transcrito seleccionado como objetivo y reduce su expresión, desencadenando la degradación, inhibiendo la traducción, o mediante otros medios, se considera que es un siARN, y cualquier estructura que genere tal siARN (es decir, que sirva como precursor del ARN) es útil en los métodos descritos anteriormente.

Un método adicional de interferencia de ARN es el uso de ARNs de horquilla corta (shARN). Se administra un plásmido que contiene una secuencia de ADN que codifica una secuencia de siARN deseada particular a una célula seleccionada como objetivo por medio de transfección o infección mediada por virus. Una vez en la célula, la secuencia de ADN se transcribe continuamente hasta moléculas de ARN que giran sobre sí mismas y forman estructuras en horquilla por medio del emparejamiento de bases intramolecular. Estas estructuras en horquilla, una vez procesadas por la célula, son equivalentes a las moléculas de siARN transfectadas y son usadas por la célula

para actuar como mediadores en el ARNi de la proteína deseada. El uso de shARN tiene una ventaja sobre la transfección con siARN, ya que el primero puede conducir a una inhibición estable a largo plazo de la expresión de proteínas. La inhibición de la expresión de proteínas por los siARNs transfectados es un fenómeno transitorio que no se da durante periodos de tiempo mayores de varios días. En ciertos casos, esto se puede preferir y desear. En los casos en los que sean necesarios periodos más largos de inhibición de proteínas, es preferible la inhibición mediada por shARN. Se prefiere especialmente el uso de shARN. En general, los vectores que codifican siARN son construcciones que comprenden un promotor, una secuencia del gen seleccionado como objetivo a silenciar en la orientación "directa", un espaciador, la inversa de la secuencia del gen seleccionado como objetivo, y un terminador.

La inhibición de la expresión de endosialina se puede efectuar también mediante otros medios que son conocidos y que se ponen en práctica fácilmente en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar ácidos nucleicos inversos. Los transcritos de ARN inversos tienen una secuencia de bases complementaria a parte o a la totalidad de cualquier otro transcrito de ARN en la misma célula. Se ha demostrado que tales transcritos modulan la expresión génica por medio de una diversidad de mecanismos que incluyen la modulación del corte y empalme del ARN, la modulación del transporte del ARN y la modulación de la traducción del mRNA (Denhardt (1992) *Ann. N Y Acad. Sci.*, 660:70-6, 1992; Nellen *et al.* (1993) *Trends Biochem. Sci.*, 18:419-23; y Baker *et al.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta.*, 1489: 3-18). Por lo tanto, la inhibición de endosialina en una célula se puede llevar a cabo expresando una molécula inversa de ácido nucleico en la célula.

Los ácidos nucleicos inversos son en general ácidos nucleicos monocatenarios (ADN, ARN, ADN modificado, o ARN modificado) complementarios a una porción de un ácido nucleico seleccionado como objetivo (p.ej., un transcrito de mRNA), y por lo tanto capaces de unirse al objetivo para formar una molécula doble. En general, son oligonucleótidos que tienen una longitud que oscila de 15 a 35 nucleótidos, pero pueden tener una longitud que oscila de 10 hasta aproximadamente 50 nucleótidos. La unión reduce o inhibe en general la función del ácido nucleico seleccionado como objetivo, tal como un gen que codifica endosialina. Por ejemplo, los oligonucleótidos inversos pueden bloquear la transcripción cuando se unen al ADN genómico, inhibir la traducción cuando se unen al mRNA, y/o conducir a la degradación del ácido nucleico. La inhibición de la expresión de endosialina se puede conseguir mediante la administración de ácidos nucleicos inversos o ácidos nucleicos de péptidos que comprenden secuencias complementarias a las del mRNA que codifica la proteína endosialina. La tecnología de ácidos nucleicos inversos y sus aplicaciones son muy conocidas en la técnica, y se describen en Phillips (ed.) *Antisense Technology, Methods Enzymol.*, 2000, Volúmenes 313 y 314, Academic Press, San Diego, y las referencias mencionadas en ese documento. Véase también Crooke (ed.) "ANTISENSE DRUG TECHNOLOGY: PRINCIPLES, STRATEGIES, AND APPLICATIONS" (1ª Edición) Marcel Dekker y las referencias citadas en él.

Se pueden sintetizar oligonucleótidos inversos con una secuencia de bases que es complementaria a una porción de cualquier transcrito de ARN de la célula. Los oligonucleótidos inversos pueden modular la expresión génica por medio de una diversidad de mecanismos que incluyen la modulación del corte y empalme del ARN, la modulación del transporte del ARN y la modulación de la traducción del mRNA. Se pueden alterar diversas propiedades de los oligonucleótidos inversos que incluyen la estabilidad, toxicidad, distribución tisular, y absorción celular y afinidad de unión por medio de modificaciones químicas que incluyen (i) la sustitución del esqueleto fosfodiéster (p.ej., ácido nucleico peptídico, oligonucleótidos de fosforotioato, y oligonucleótidos de fosforamidato), (ii) la modificación de la base de carbohidrato (p.ej., 2'-O-propilribosa y 2'-metoxietoxirribosa), y (iii) la modificación del nucleósido (p.ej., C-5 propinil U, C-5 tiazol U, y fenoxazina C) (Wagner (1995) *Nat. Medicine*, 1:1116-8; Varga *et al.* (1999) *Immun. Lett.*, 69:217-24; Neilsen (1999) *Curr. Opin. Biotech.*, 10:71-5; y Woolf (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:1763-9).

La inhibición de la expresión génica de endosialina se puede efectuar también mediante el uso de ribozimas. Se ha demostrado que ciertas moléculas de ácido nucleico denominadas ribozimas o desoxirribozimas catalizan la escisión específica de secuencia de moléculas de ARN. El sitio de escisión está determinado por el emparejamiento complementario de nucleótidos en la enzima de ARN o ADN con los nucleótidos del ARN seleccionado como objetivo. Así, las enzimas de ARN y ADN se pueden diseñar para escindir cualquier molécula de ARN, por lo que se incrementa su velocidad de degradación (Cotten *et al.* (1989) *EMBO J.*, 8:861-6; y Usman *et al.* (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1:527-33). Las ribozimas en cabeza de martillo también se usan de forma rutinaria en la regulación génica (Lyngstadaas (2001) *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 12:469-78).

Las células seleccionadas como objetivo mediante los métodos anteriores se pueden transformar de manera específica con ácidos nucleicos de silenciamiento de la transcripción tales como shARN o siARN, o se puede transformar con vectores que codifican tales ácidos nucleicos de forma que la célula expresa las moléculas inhibitoras de ácido nucleico. La transformación de las células se puede llevar a cabo según cualquier medio adecuado en la técnica, que incluye los descritos y ejemplificados en la presente memoria.

Los oligonucleótidos señuelo también son adecuados para regular la expresión de los genes que codifican endosialina. Los ensayos clínicos recientes han ensayado la capacidad de los oligonucleótidos señuelo de secuestrar proteínas patógenas. Los oligonucleótidos señuelo contienen en general un elemento potenciador que puede penetrar en las células, y una vez dentro de las células, los oligonucleótidos señuelo se unen a las proteínas de unión al ADN específicas de secuencia e interfieren con la transcripción (Fichou *et al.* (2006) *Trends Biotechnol.*, 24:563-70; Nakamura *et al.* (2002) *In Vivo*, 16:45-8; Tomita *et al.* (1997) *Exp. Nephrol.*, 5:429-34).

La regulación genética de la expresión de endosialina también se puede efectuar mediante la inactivación del gen que codifica endosialina. Como apreciarán los expertos en la técnica, se puede usar la secuencia del gen de endosialina (de cualquier organismo de interés), por ejemplo, SEQ ID N°: 1, 3, o 5, para generar moléculas de ácido nucleico y vectores para inactivar la expresión del gen de endosialina. Consideradas en cuanto a sus secuencias, las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias reguladoras, en particular inhibitorias, derivadas de SEQ ID N°s: 1, 3, y 5, incluyen las variantes alélicas, homólogos, y mutantes naturales de SEQ ID N°s: 1, 3, y 5. Debido a que se espera que tales variantes y homólogos posean ciertas diferencias en la secuencia de nucleótidos, se pueden usar polinucleótidos aislados que tienen al menos alrededor del 60%, preferiblemente al menos alrededor del 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% o 70%, más preferiblemente al menos alrededor del 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, o 80%, aún más preferiblemente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, y aún más preferiblemente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, y lo más preferiblemente 96%, 97%, 98% y 99% o más identidad con cualquier ácido nucleico de inactivación derivado de SEQ ID N°s: 1, 3, o 5. Debido a que la variación de secuencias naturales existe probablemente entre los genes que codifican estas secuencias reguladoras en los diferentes organismos, un experto en la técnica esperaría hallar este nivel de variación, a la vez que se mantienen todavía las propiedades únicas de los polinucleótidos de inactivación. Por lo tanto, tales variantes y homólogos se consideran sustancialmente iguales entre sí.

Las moléculas de ácido nucleico de inactivación se pueden preparar mediante dos métodos generales: (1) se pueden sintetizar a partir de trifosfatos de nucleótidos adecuados, o (2) se pueden aislar a partir de fuentes biológicas. Ambos métodos utilizan protocolos muy conocidos en la técnica.

La disponibilidad de información de secuencias de nucleótidos, tal como la secuencia de ácido nucleico completa de endosialina, por ejemplo, SEQ ID N°s: 1, 3, y 5, permite la preparación de una molécula de ácido nucleico aislada mediante síntesis de oligonucleótidos. Se pueden preparar oligonucleótidos sintéticos mediante el método de fosforamidita empleado en el sintetizador de ADN de Applied Biosystems 38A o dispositivos similares. La construcción resultante se puede purificar según los métodos conocidos en la técnica, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Una molécula de ADN sintética así construida se puede clonar después y amplificarla en un vector adecuado.

Los ácidos nucleicos de inactivación se pueden mantener en forma de ADN en cualquier vector de clonación adecuado. Los clones se pueden mantener en un vector plasmídico de clonación/expresión, cualquiera de los cuales se puede propagar en una célula hospedadora procariótica o eucariótica adecuada.

Las moléculas de ácido nucleico de inactivación incluyen cADN, ADN genómico, ARN, y fragmentos de los mismos que pueden ser monocatenarios, bicatenarios o incluso tricatenarios. Así, se pueden usar oligonucleótidos (cadenas directas o inversas de ADN o ARN) que tienen secuencias capaces de hibridar con al menos una secuencia de una molécula de ácido nucleico como se discutió anteriormente, en particular, SEQ ID N°s: 1, 3, o 5. Tales oligonucleótidos son útiles como sondas para detectar genes que codifican endosialina, o para la regulación positiva o negativa de la expresión de genes que codifican endosialina en o antes de la traducción del mRNA hasta la proteína. Los métodos en los que se pueden usar oligonucleótidos o polinucleótidos como sondas para tales ensayos incluyen, pero sin limitación: (1) hibridación *in situ*; (2) hibridación de Southern (3) hibridación de Northern; y (4) reacciones de amplificación diversas, tales como reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR).

Se pueden usar vectores y equipos para producir células hospedadoras transgénicas que comprenden un polinucleótido que codifica una secuencia reguladora para inhibir la expresión de endosialina, u homólogos, análogos o variantes de la misma en una orientación directa o inversa, o una construcción bajo el control de promotores específicos de células o tejidos y/u otras secuencias reguladoras. Tales vectores son adecuados para modular, y preferiblemente inhibir, la expresión de endosialina.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen, pero sin limitación, células vegetales, células bacterianas, células de levadura y otras células fúngicas, células de insecto y células de mamífero que expresan endosialina. Las células se pueden transformar de manera neoplásica. Las más preferidas son las células humanas.

Los vectores para transformar una amplia diversidad de estas células hospedadoras son muy conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagómidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BACs), cromosomas artificiales de levadura (YACs), así como otros vectores bacterianos, de levadura y virales.

La región codificante de una secuencia reguladora se puede colocar bajo un promotor constitutivo potente, tal como los promotores de los genes siguientes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato quinasa, beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano, y otros. Además, muchos promotores virales funcionan de manera constitutiva en las células eucarióticas y son adecuados para el uso en la presente invención. Tales promotores virales incluyen, sin limitación, el promotor temprano inmediato de Citomegalovirus (CMV), los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), las repeticiones terminales largas (LTRs) del virus de la leucemia de Moloney, el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus del sarcoma de Rous (RSV), y otros

retrovirus, y el promotor de timidina quinasa del virus Herpes Simplex. Los expertos en la técnica conocen otros promotores. La región codificante de la secuencia reguladora se puede colocar bajo un promotor inducible tal como el promotor de metalotioneína, promotor inducible de tetraciclina, promotor inducible de doxiciclina, promotores que contienen uno o más elementos de respuesta a la estimulación por interferón (ISRE) tales como proteína quinasa R 2',5'-oligoadenilato sintetasas, genes Mx, ADAR1, y similares. Los expertos en la técnica conocerán otros promotores inducibles adecuados.

Los vectores de inactivación se pueden usar para transformar diversas células que expresan endosialina con secuencias reguladoras de ácidos nucleicos. Se conocen numerosos métodos en la técnica para la introducción de genes exógenos en las células, y se pueden usar para construir células recombinantes con el fin de llevar a cabo los métodos anteriores. La técnica usada debería posibilitar la transferencia estable de la secuencia génica heteróloga en la célula hospedadora, de forma que la secuencia génica heteróloga sea heredable y expresable por la descendencia de la célula, y de forma que no se altere el desarrollo y las funciones fisiológicas necesarias de las células receptoras. Las técnicas que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, la transferencia de cromosomas (p.ej., fusión de células, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas), métodos físicos (p.ej., transfección, fusión de esferoplastos, microinyección, electroporación, liposomas portadores), transferencia de vectores virales (p.ej., virus de ADN recombinante, virus de ARN recombinante) y similares (descritas en Cline (1985) *Pharmac. Ther.*, 29:69-92).

Se pueden crear células con inactivación con una expresión inhibida de endosialina inhibiendo la traducción del mRNA que codifica la proteína de transporte mediante "silenciamiento génico post-transcripcional". El gen de la especie seleccionada como objetivo para la inhibición, o un fragmento del mismo, se puede utilizar para controlar la producción de la proteína codificada. Se pueden usar moléculas inversas de tamaño completo para este propósito. De manera alternativa, se pueden utilizar oligonucleótidos inversos dirigidos a regiones específicas del mRNA que son críticas para la traducción. Se pueden proporcionar moléculas inversas *in situ* transformando células con una construcción de ADN que, tras la transcripción, produce las secuencias de ARN inversas. Tales construcciones se pueden diseñar para producir secuencias inversas de tamaño completo o parcial. Este efecto de silenciamiento génico se puede aumentar mediante la sobreproducción transgénica del ARN directo e inverso de la secuencia génica codificante de forma que se produce una cantidad elevada de dsARN (por ejemplo, véase Waterhouse *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:13959-64). A este respecto, se ha descubierto que el dsARN que contiene secuencias que corresponden a parte o la totalidad de al menos un intrón es especialmente eficaz. Se puede expresar parte o la totalidad de la cadena inversa de la secuencia codificante mediante un transgén. Las cadenas directa e inversa hibridantes de parte o la totalidad de la secuencia codificante de una endosialina se pueden expresar de manera transgénica.

Las células que se pueden seleccionar como objetivo o usar de otra manera en los métodos anteriores incluyen las células que expresan endosialina que expresan de manera natural endosialina o las células transfectadas con un plásmido recombinante que expresan endosialina. Las células que expresan endosialina de manera primaria se pueden aislar a partir de tejidos o adquirir de vendedores que comercializan células endoteliales, tales como, pero sin limitación, HUVEC o HMVEC así como fibroblastos primarios y cultivados. Las células transfectadas incluyen cualquier línea celular de expresión de insectos conocida, tal como, por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda*. Las líneas celulares de expresión pueden ser también líneas celulares de levadura, tales como, por ejemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de expresión pueden ser también células de mamífero tales como, por ejemplo, ovario de hámster chino, células de riñón de crías de hámster, línea de riñón embrionario humano 293, líneas celulares de riñón de perro normal, líneas celulares de riñón de gato normal, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano, células COS, y células G8 de mioblasto de ratón no tumorigénicas, líneas celulares de fibroblastos, líneas celulares de mieloma, células NIH/3T3 de ratón, células LMTK, células de sertoli de ratón, células de carcinoma de cuello uterino humano, células de hígado de rata común, células de pulmón humano, células de hígado humano, células de tumor mamario de ratón, células TRI, células MRC 5, y células FS4.

La inhibición de la expresión de endosialina inhibe la interacción de endosialina con cualquier ligando de endosialina. Los ligandos de endosialina incluyen las proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina y colágeno.

También se presentan de acuerdo con la presente invención anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos para inhibir la interacción de la endosialina expresada por una célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina que comprenden bloquear u obstruir la expresión de endosialina por la célula. Así, por ejemplo, una barrera física sirve para inhibir, impedir, o de otra manera dificultar la interacción de la endosialina expresada con un ligando de endosialina. Cualquier producto químico o biomolécula puede servir para obstruir esta interacción.

En ciertas realizaciones preferidas, la inhibición de la interacción de una célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina comprende inhibir la unión del ligando de endosialina a la endosialina expresada. Por ejemplo, la interacción entre endosialina y su ligando se dificulta, bloquea, impide, u obstruye de otra manera con una barrera molecular. De esta manera, se dificulta, inhibe, bloquea, impide, obstruye o previene el acceso a la célula por el ligando. La obstrucción de la endosialina se puede dar mediante cualquier medio adecuado en la técnica, tal como con un producto químico o biomolécula.

Los productos químicos incluyen, pero sin limitación, estructuras de aminoácidos, esteroides, ciclinas, antracenos, metales pesados, quinilona, terpenos, productos fenólicos, glicósidos, alquiloides, lípidos, etc., o mezclas de los mismos que pueden ejercer un efecto biológico sobre las células que expresan endosialina. Los productos químicos se pueden generar mediante síntesis química o pueden proceder de biocatálisis o pueden proceder de fluidos biológicos. Los productos químicos pueden proceder de fuentes humanas, de mamíferos no humanos, plantas, levaduras, hongos y/o fuentes procarióticas.

Se pueden emplear inhibidores competitivos para inhibir la interacción de endosialina o una célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina. Un "inhibidor competitivo" compite con el ligando por el sitio de unión a endosialina. Los inhibidores competitivos pueden ser ligandos de endosialina, por ejemplo, colágeno (p.ej., colágeno I o IV) o fibronectina, o fragmentos de unión a endosialina de los mismos. Los inhibidores competitivos más preferidos son el fragmento N-terminal de 70 kDa de fibronectina, el fragmento de unión a gelatina de 45 kDa de fibronectina, y el fragmento de unión a heparina de 30 kDa de fibronectina.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se usan para obstruir la interacción de la endosialina expresada con los ligandos de endosialina. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser específicos para un epítipo de endosialina, o pueden ser específicos para un epítipo de un ligando de endosialina. Se prefieren más los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos específicos de endosialina. Los anticuerpos hacia ligandos tales como fibronectina, colágeno, y similares están disponibles comercialmente.

Los anticuerpos adecuados pueden ser policlonales o monoclonales, o pueden ser derivados o fragmentos de anticuerpos que conservan la especificidad hacia endosialina o un ligando de endosialina. Los anticuerpos pueden ser de cualquiera de las cinco clases de anticuerpos, es decir, los isotipos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Los anticuerpos adecuados también incluyen el isotipo IgY hallado en general en el suero de gallinas y pavos y en la yema de huevo de gallinas y pavos.

Los derivados de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno son adecuados para el uso en los métodos inventivos, y tales derivados comprenden porciones de anticuerpos intactos que conservan la especificidad de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo originaria. Por ejemplo, los derivados pueden comprender al menos una región variable (una región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera). Los ejemplos de derivados y fragmentos de anticuerpos adecuados incluyen, sin limitación, anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y moléculas de cadena simple, así como moléculas Fab, F(ab')₂, Fd, Fabc, y Fv, anticuerpos de cadena simple (Sc), cadenas ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, monómeros o dímeros de cadenas pesadas, monómeros o dímeros de cadenas ligeras, dímeros que consisten en una cadena pesada y una ligera, y similares. Se pueden usar todos los isotipos de anticuerpos para producir los derivados y fragmentos de anticuerpos. Se pueden producir derivados y fragmentos de anticuerpos de manera recombinante.

Los anticuerpos pueden proceder de cualquier especie. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser de ratón, rata, cabra, caballo, cerdo, ganado bovino, pollo, conejo, burro, ser humano, y similares. Para el uso en los métodos de tratamiento, o para la administración a seres humanos, los anticuerpos que no proceden de humanos se pueden alterar estructuralmente para que sean menos antigénicos tras la administración a un paciente humano.

Así, en ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos usados son anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para producirlos se conocen bien y están establecidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender un dominio de unión al antígeno de ratón con un Fc humano u otro dominio estructural similar.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados pueden ser inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En ciertos casos, los residuos de la región estructural Fv (FWR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de las CDR o estructurales importadas. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar y optimizar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y en general dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FWR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), en general la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones *et al.* (1986) *Nature*, 321:522-5; Reichmann *et al.* (1988) *Nature*, 332:323-9; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-6.

En los aspectos preferidos de la invención, los anticuerpos son completamente humanos. Esto significa que el anticuerpo es únicamente de origen humano, o consiste de otra manera en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención se pueden marcar o conjugar de otra manera a diversos restos químicos o biomoléculas, por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Los restos pueden ser citotóxicos, por ejemplo, toxinas bacterianas, toxinas virales, radioisótopos, y similares. Los restos pueden ser marcadores detectables, por ejemplo, marcadores fluorescentes, radiomarcadores, biotina, y similares. Los restos adicionales incluyen, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, y amidación. Los anticuerpos de la invención se pueden derivatizar ellos mismos mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otras proteínas, y similares.

Los expertos en la técnica reconocerán que la especificidad de los anticuerpos está determinada principalmente por las seis regiones CDR, especialmente la CDR3 de la cadena H (Kala *et al.* (2002) *J. Biochem.*, 132:535-41; Morea *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.*, 275:269-94; y Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-17). Las regiones estructurales de los anticuerpos, sin embargo, pueden desempeñar un papel en las interacciones antígeno-anticuerpo (Panka *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:3080-4), en particular con respecto a su papel en la conformación de los bucles de las CDRs (Foote *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.*, 224:487-99). Así, los anticuerpos pueden comprender cualquier combinación de regiones CDR o FWR de la cadena H o L que confieren especificidad al anticuerpo hacia endosialina o los ligandos de endosialina.

En ciertas realizaciones, la invención contempla el uso de anticuerpos humanos aislados y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen de manera específica a endosialina. En ciertas realizaciones, los anticuerpos adecuados o los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de SEQ ID N°:28, 30, y 32, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de SEQ ID N°: 13, 15, y 17, respectivamente. Las CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada pueden estar codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID N°:27, 29, y 31, respectivamente. Las CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera pueden estar codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID N°:12, 14, y 16, respectivamente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una cadena pesada que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 34 y una cadena ligera que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 19. El dominio variable de la cadena pesada puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:33. El dominio variable de la cadena ligera puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:18. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:22 ó 26 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:11. La cadena pesada puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:21 ó 25 y la cadena ligera puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:10. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una cadena pesada que comprende SEQ ID N°:20 ó 24 y una cadena ligera que comprende SEQ ID N°:9. Los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°:8 ó 23. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una cadena ligera codificada por la secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID N°:7.

Las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se pueden usar de acuerdo con la invención se han depositado en la Amer. Type Cult. Coll. (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 24 de abril de 2006 y el 11 de marzo de 2008 y se les han asignado los n°s de acceso PTA-7554 y PTA-9017, respectivamente.

Se debe entender que, debido a la variación natural de secuencias que probablemente existe entre las cadenas pesadas y ligeras y los genes que las codifican, un experto en la técnica esperaría hallar cierto nivel de variación dentro de las secuencias de aminoácidos o los genes que las codifican, a la vez que todavía se mantienen las propiedades de unión únicas (p.ej., especificidad y afinidad) de los anticuerpos de la presente invención. Tal expectativa se debe en parte a la degeneración del código genético, así como al éxito evolutivo conocido de las variaciones de secuencias de aminoácidos conservativas, que no alteran de manera apreciable la naturaleza de la proteína codificada. Por lo tanto, tales variantes y homólogos se consideran sustancialmente iguales entre sí, y se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

Las variantes que tienen sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos simples o múltiples, que conservan las propiedades biológicas (p.ej., afinidad de unión o actividad efectora inmunitaria) de los anticuerpos descritos en la presente memoria se contemplan para el uso en la invención. La persona experta puede producir variantes que tienen sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos simples o múltiples. Estas variantes pueden incluir, por ejemplo: (a) variantes en las que uno o más residuos de aminoácidos se sustituyen con aminoácidos conservativos o no conservativos, (b) variantes en las que uno o más aminoácidos se añaden o se eliminan del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que el polipéptido se fusiona con otro péptido o polipéptido tal como una molécula de fusión, una etiqueta proteica u otro resto químico, que puede conferir propiedades útiles al polipéptido, tal como, por ejemplo, un epítopo para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, un resto de biotina y similares. Los anticuerpos de la invención pueden incluir variantes en las que los residuos de aminoácidos de una especie se sustituyen por el residuo correspondiente en otra especie, en

posiciones conservadas o no conservadas. En otras realizaciones, los residuos de aminoácidos en posiciones no conservadas se sustituyen con residuos conservativos o no conservativos. Las técnicas para obtener estas variantes, que incluyen técnicas genéticas (eliminaciones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas, y enzimáticas, son conocidas para la persona que tiene una experiencia habitual en la técnica.

5 La presente invención contempla anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales a las secuencias de aminoácidos previamente descritas. Por ejemplo, tales anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir aquellos en los que las CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada son al menos un 90% idénticas a SEQ ID N°:28, 30, y 32, respectivamente, y/o en los que las CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera son al menos un 90% idénticas a
 10 SEQ ID N°: 13, 15, y 17, respectivamente. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir aquellos en los que el dominio variable de la cadena pesada es al menos un 90% idéntico a SEQ ID N°: 34 y/o en los que el dominio variable de la cadena ligera es al menos un 90% idéntico a SEQ ID N°: 19. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir aquellos en los que la cadena pesada es al menos un 90% idéntica a SEQ ID N°:22 ó 26 y/o en los que la cadena ligera es al menos un
 15 90% idéntica a SEQ ID N°:11. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden incluir aquellos en los que la cadena pesada es al menos un 90% idéntica a SEQ ID N°:20 ó 24 y/o en los que la cadena ligera es al menos un 90% idéntica a SEQ ID N°:9. Por ejemplo, los anticuerpos M4 y M4.1 son anticuerpos humanizados hacia la endosialina humana. Aunque los anticuerpos M4 y M4.1 comparten una secuencia de la cadena ligera, difieren en su cadena pesada por una secuencia de un único aminoácido mostrada, por ejemplo, en el residuo 429 de SEQ ID
 20 N°:20 respecto del residuo 429 de SEQ ID N°:24. La invención contempla además anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que compiten por la unión a endosialina con los anticuerpos M4 o M4.1. La invención contempla además anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen al mismo epítipo de endosialina que los anticuerpos M4 o M4.1.

25 Los anticuerpos de la invención pueden tener afinidades de unión por el antígeno seleccionado como objetivo, tal como endosialina o un ligando de endosialina, que incluyen una constante de disociación (K_D) menor de 1×10^{-2} M, menor de 1×10^{-3} M, menor de 1×10^{-4} M, menor de 1×10^{-5} M, o menor de 1×10^{-6} M. En una realización, la K_D es menor de 1×10^{-7} M. La K_D puede ser menor de 1×10^{-8} M, menor de 1×10^{-9} M, menor de 1×10^{-10} M, menor de 1×10^{-11} M, menor de 1×10^{-12} M, menor de 1×10^{-13} M, menor de 1×10^{-14} M, menor de 1×10^{-15} M.

30 La especificidad y/o afinidad de los anticuerpos que se unen a endosialina se puede optimizar opcionalmente mediante evolución dirigida de las células que producen el anticuerpo, mediante el uso de un alelo negativo dominante de un gen de reparación de emparejamientos incorrectos tal como PMS1, PMS2, PMS2-134, PMSR2, PMSR3, MLH1, MLH2, MLH3, MLH4, MLH5, MLH6, PMSL9, MSH1, y MSH2 introducido en las células productoras de anticuerpos. Las células que contienen los mutantes negativos dominantes se harán hipermutables y acumularán mutaciones a una velocidad más elevada que las células de control sin transfectar. Se puede cribar una mezcla de
 35 las células mutantes en busca de los clones que producen una afinidad/especificidad mayor de los anticuerpos o las proteínas de unión, o que producen títulos mayores de los anticuerpos o las proteínas de unión, o que simplemente crecen más rápido o mejor en ciertas condiciones. La técnica para generar células hipermutables mediante el uso de alelos negativos dominantes de genes de reparación de emparejamientos incorrectos se describe en la patente de EE.UU. n° 6.146.894. De manera alternativa, la reparación de emparejamientos incorrectos se puede inhibir
 40 mediante el uso de los inhibidores químicos de la reparación de emparejamientos incorrectos descritos en el documento WO 02/054856. La técnica para incrementar los anticuerpos mediante el uso de los alelos negativos dominantes de genes de reparación de emparejamientos incorrectos o inhibidores químicos de la reparación de emparejamientos incorrectos también se puede aplicar a células de expresión de mamífero, levadura, vegetales o procariontes que expresan genes de inmunoglobulinas o proteínas clonadas. Las células que expresan los alelos
 45 negativos dominantes o la molécula pequeña se pueden "curar" ya que el alelo negativo dominante se puede inactivar, si es inducible, eliminar de la célula mientras el producto químico pequeño se puede eliminar del cultivo, lo que da como resultado que las células sean genéticamente estables una vez más y ya no acumulen mutaciones a una velocidad anormalmente elevada.

50 La inhibición de la expresión de endosialina inhibe la interacción de endosialina con cualquier ligando de endosialina. Los ligandos de endosialina son fibronectina y colágeno. Cualquier subtipo de colágeno puede servir como ligando para endosialina. Se prefiere más el Colágeno I y Colágeno IV.

La inhibición de la interacción de endosialina con los ligandos de endosialina inhibe rutas y cascadas que están aumentadas o activadas de otra manera como resultado de esta interacción. Por ejemplo, la interacción de endosialina con los ligandos de endosialina puede estimular la expresión y/o activación de moléculas de adhesión
 55 tales como integrinas, que median en la unión de las células a la matriz extracelular o a otras células, y que median en rutas de señalización celular, entre otras cosas.

Las integrinas tienden a existir en forma de heterodímeros que contienen dos cadenas diferentes, una subunidad α (alfa) y β (beta). Existen aproximadamente 18 subunidades α y 8 subunidades β que han sido caracterizadas. Además, existen varias subunidades de integrinas en forma de variantes por medio de un corte y empalme
 60 diferencial. Las diversas combinaciones de subunidades de integrina alfa y beta da como resultado más de 24 complejos activos únicos de integrinas (Hynes (2002) *Cell*, 110:673). Las subunidades de integrina penetran en la

membrana plasmática, y en general contienen dominios citoplasmáticos cortos de alrededor de 40-70 aminoácidos. Fuera de la membrana plasmática celular, las cadenas alfa y beta están situadas en estrecha proximidad entre sí a lo largo de una longitud de alrededor de 23 nm. Los extremos aminotermiales de cada cadena de integrina están yuxtapuestos en 5 nm entre sí para formar una región de unión al ligando para la interacción con EMP. Las integrinas se clasifican mediante el uso de varios criterios. Las cadenas alfa se clasifican como tales porque un subgrupo de las cadenas α tienen elementos estructurales insertados cerca del extremo aminoterminal denominado dominio alfa-A porque tiene un motivo estructural similar a los dominios A del factor de von Willebrand. Las integrinas que portan este dominio se pueden unir a colágenos (complejos de integrina $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$), o actuar como moléculas de adhesión célula-célula con los complejos que contienen integrinas de la familia $\beta 2$. Dos funciones importantes de las integrinas son la unión de la célula a las proteínas de la matriz extracelular y la transducción de señales mediada por la unión EMP-integrina a la célula. Además, las integrinas también están implicadas en una amplia diversidad de otras actividades biológicas que incluyen la unión de virus, tales como adenovirus, Echovirus, Hantavirus, virus de la glosopeda, así como la unión a células implicadas en la vigilancia inmunitaria y el contacto célula-célula para la migración celular. Las integrinas acoplan las EMPs (lo que depende del complejo de integrinas) al citoesqueleto dentro de la célula. Se han identificado varios ligandos de las integrinas. Los ligandos más habituales son fibronectina, vitronectina, colágeno, y laminina. Las interacciones entre integrina, una EMP y los microfilamentos dentro de la célula están asociadas por medio de proteínas estructurales que incluyen talina, paxilina y alfa-actinina. Estas interacciones dan como resultado la regulación de quinasas similares a FAK (quinasa de adhesión focal) y miembros de la familia de quinasas Src para fosforilar sustratos tales como p130CAS, por lo que se reclutan adaptadores de señalización tales como Crk para actuar como mediadores en respuestas celulares que incluyen la activación de rutas, la proliferación y/o la supervivencia celular. Cualquiera de estas funciones asociadas a las integrinas se puede ensamblar en forma de un ensayo de cribado para monitorizar la actividad de integrinas en función de la actividad de endosialina para los ensayos para identificar los agentes farmacológicos o las moléculas de selección como objetivo de endosialina eficaces de esta invención. Además, en vista de la invención descrita en el presente documento, la selección como objetivo de las integrinas con agentes farmacológicos hacia endosialina en las células que expresan endosialina es una gran oportunidad para la inhibición de la infección viral mediada por integrinas y otras patologías.

Así, la inhibición de la interacción de endosialina con un ligando de endosialina inhibe la expresión y/o activación de las moléculas de integrina en la célula que expresa endosialina. La expresión o activación de integrina $\beta 1$, $\beta 2$, o $\beta 3$ se puede reprimir mediante la inhibición.

Otras moléculas y rutas cuya expresión y/o activación se ven afectadas por la inhibición de la interacción de endosialina con los ligandos de endosialina incluyen las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Las MMPs son proteasas dependientes de zinc que desempeñan un papel, entre otras cosas, en la degradación de proteínas de la matriz extracelular, receptores de la superficie celular, y similares. Las MMPs desempeñan un papel en la migración celular, proliferación, y angiogénesis, entre otras cosas. La familia MMP de enzimas tiene un motivo de unión de zinc común (HExxHxxGxxH) en su sitio activo, y una metionina conservada tras el sitio activo. Las MMPs se clasifican por su homología mutua, especificidad por el sustrato y parcialmente por su localización celular. Se agrupan en líneas generales en 4 clases: collagenasa, estromelinas, gelatinasa, y las MMPs de tipo membrana (MT-MMPs). Las MMPs de tipo collagenasa son capaces de degradar colágenos fibrilares de triple hélice hasta fragmentos característicos. Estos colágenos son los componentes principales del hueso y cartílago, y esta clase de MMPs son las únicas enzimas de mamífero conocidas capaces de degradarlos. Estas incluyen MMP-1 (colagenasa intersticial); MMP-8 (colagenasa de neutrófilos); MMP-13 (colagenasa 3); y MMP-18. Las enzimas MMP de tipo estromelina exhiben una capacidad amplia para escindir EMPs, pero son incapaces de escindir los colágenos fibrilares de triple hélice. Esta clase incluye MMP-3 (estromelina 1); MMP-10 (estromelina 2); MMP-11 (estromelina 3); MMP-12 (metaloelastasa de macrófagos); MMP-19 (RASI-1, también denominada estromelina-4); y MMP-20 (enamelinasa); MMP-22 (C-MMP) y MMP-27. Las MMPs de tipo gelatinasa degradan principalmente colágeno de tipo IV y gelatina, y se distinguen por la presencia de un dominio adicional insertado en el dominio catalítico. Esta región de unión a gelatina está colocada inmediatamente antes del motivo de unión de zinc, y forma una unidad de plegamiento distinta que no altera la estructura del dominio catalítico. Esta clase incluye MMP-2 (gelatinasa de 72 kDa, gelatinasa-A); MMP-9 (gelatinasa de 92 kDa, gelatinasa-B). Finalmente, las MMPs asociadas a la membrana son aquellas que se unen a la membrana celular externa. Estas incluyen: La MMP-23 con serie de cisteínas transmembrana de tipo II; las MMPs 17 y 25 unidas a través de glicosil fosfatidilinositol (MT4-MMP y MT6-MMP, respectivamente); y las MMPs 14, 15, 16, 24 transmembrana de tipo I (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, y MT5-MMP, respectivamente). Todas estas MMPs tienen un sitio de escisión de furina en el pro-péptido, que es una característica compartida también por MMP-11.

Así, la inhibición de la interacción de endosialina con un ligando de endosialina inhibe la expresión y/o activación de las MMPs en la célula que expresa endosialina. En ciertas realizaciones preferidas, la expresión o activación de MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, o MMP-18 se elimina mediante la inhibición.

Sin pretender limitarse por ninguna teoría particular o mecanismo de funcionamiento, se cree que la endosialina actúa directamente o indirectamente en la angiogénesis, en particular con respecto a la neovascularización y enfermedades tales como el cáncer. Por lo tanto, se cree que la alteración de la unión de endosialina o de las células que expresan endosialina a los ligandos de endosialina, o la alteración de la activación mediada por endosialina de las integrinas, la expresión de MMPs y/o la proliferación/supervivencia celular pueden inhibir la

vascularización asociada a las enfermedades neovasculares.

Por lo tanto, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden usar para inhibir la angiogénesis. Los métodos se pueden llevar a cabo *in vivo*. Se puede administrar un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que obstruye la endosialina expresada en la superficie de una célula, en el que dicha obstrucción inhibe la interacción de dicha célula con un ligando de endosialina, y en el que la inhibición de dicha interacción de dicha célula con dicho ligando inhibe la angiogénesis de un tejido, órgano, o neoplasia en el sujeto.

Una célula, cultivo celular, tejido, u órgano se puede poner en contacto con una composición que obstruye la endosialina expresada sobre la superficie de una célula, en la que dicha obstrucción inhibe la interacción de dicha célula con un ligando de endosialina, y en la que la inhibición de dicha interacción de dicha célula con dicho ligando inhibe la angiogénesis de dicha célula, cultivo celular, tejido, u órgano.

La composición puede comprender al menos un inhibidor competitivo descrito en la presente memoria. Los inhibidores competitivos pueden ser ligandos de endosialina, por ejemplo, colágeno, fibronectina, o fragmentos de unión a endosialina de los mismos. Los inhibidores competitivos preferidos son fragmentos de colágeno I, colágeno IV, o fibronectina. Los inhibidores competitivos más preferidos son el fragmento N-terminal de 70 kDa de fibronectina, el fragmento de unión a gelatina de 45 kDa de fibronectina, y el fragmento de unión a heparina de 30 kDa de fibronectina.

La composición puede comprender al menos un anticuerpo que se une de manera específica a endosialina. Tales anticuerpos tienen preferiblemente una afinidad hacia endosialina que es menor de alrededor de 1×10^{-7} M, más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-8} M, más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-9} M, y más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-10} M. Los anticuerpos que se unen de manera específica a endosialina pueden incluir los anticuerpos cuyas características se describen y se ejemplifican en la presente memoria. Por ejemplo, en ciertos aspectos preferidos, el anticuerpo que se une de manera específica a endosialina comprende una cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de SEQ ID N°:28, 30, y 32, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de SEQ ID N°: 13, 15, y 17, respectivamente. Las CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada pueden estar codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID N°:27, 29, y 31, respectivamente. Las CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera pueden estar codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID N°:12, 14, y 16, respectivamente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 34 y una cadena ligera que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 19. El dominio variable de la cadena pesada puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:33. El dominio variable de la cadena ligera puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:18. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:22 ó 26 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:11. La cadena pesada puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:21 ó 25 y la cadena ligera puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:10. Los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada que comprende SEQ ID N°:20 ó 24 y una cadena ligera que comprende SEQ ID N°:9. Los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°:8 ó 23. Los anticuerpos pueden comprender una cadena ligera codificada por la secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID N°:7. Las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se pueden usar de acuerdo con la invención se han depositado en la Amer. Type Cult. Coll. (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 24 de abril de 2006 y el 11 de marzo de 2008 y se les han asignado los n°s de acceso PTA-7554 y PTA-9017, respectivamente. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos de unión al antígeno, quiméricos, humanizados, completamente humanos, y similares como se describió en la presente memoria.

La inhibición de la expresión de endosialina inhibe la interacción de endosialina con cualquier ligando de endosialina. Los ligandos de endosialina implicados en la presente invención son fibronectina y colágeno.

La invención se puede usar también para inhibir la neovascularización. Los métodos se pueden llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*. Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que obstruye la endosialina expresada en la superficie de una célula, en la que dicha obstrucción inhibe la interacción de dicha célula con un ligando de endosialina, y en la que la inhibición de dicha interacción de dicha célula con dicho ligando inhibe la neovascularización de un tejido, órgano, o neoplasia en el sujeto.

Una célula, cultivo celular, tejido, u órgano se puede poner en contacto con una composición que obstruye la endosialina expresada sobre la superficie de una célula, en la que dicha obstrucción inhibe la interacción de dicha célula con un ligando de endosialina, y en la que la inhibición de dicha interacción de dicha célula con dicho ligando inhibe la neovascularización de dicha célula, cultivo celular, tejido, u órgano.

La composición puede comprender al menos un inhibidor competitivo descrito en la presente memoria. Los inhibidores competitivos pueden ser ligandos de endosialina, por ejemplo, colágeno, fibronectina, o fragmentos de unión a endosialina de los mismos. Los inhibidores competitivos preferidos son fragmentos de colágeno I, colágeno IV, o fibronectina. Los inhibidores competitivos más preferidos son el fragmento N-terminal de 70 kDa de fibronectina, el fragmento de unión a gelatina de 45 kDa de fibronectina, y el fragmento de unión a heparina de 30

kDa de fibronectina.

En las realizaciones preferidas, la composición comprende al menos un anticuerpo que se une de manera específica a endosialina. Tales anticuerpos tienen preferiblemente una afinidad hacia endosialina que es menor de alrededor de 1×10^{-7} M, más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-8} M, más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-9} M, y más preferiblemente menor de alrededor de 1×10^{-10} M. Los anticuerpos que se unen de manera específica a endosialina pueden incluir los anticuerpos cuyas características se describen y se ejemplifican en la presente memoria. Por ejemplo, en ciertos aspectos preferidos, el anticuerpo que se une de manera específica a endosialina comprende una cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de SEQ ID N°:28, 30, y 32, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de SEQ ID N°: 13, 15, y 17, respectivamente. Las CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada pueden estar codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID N°:27, 29, y 31, respectivamente. Las CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera pueden estar codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID N°:12, 14, y 16, respectivamente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 34 y una cadena ligera que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 19. El dominio variable de la cadena pesada puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:33. El dominio variable de la cadena ligera puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:18. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:22 ó 26 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:11. La cadena pesada puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:21 ó 25 y la cadena ligera puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°:10. Los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada que comprende SEQ ID N°:20 ó 24 y una cadena ligera que comprende SEQ ID N°:9. Los anticuerpos pueden comprender una cadena pesada codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°:8 ó 23. Los anticuerpos pueden comprender una cadena ligera codificada por la secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID N°:7. Las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se pueden usar de acuerdo con la invención se han depositado en la Amer. Type Cult. Coll. (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 24 de abril de 2006 y el 11 de marzo de 2008 y se les han asignado el n° de acceso PTA-7554 y el n° de acceso PTA-9017, respectivamente. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos de unión al antígeno, quiméricos, humanizados, completamente humanos, y similares como se describió en la presente memoria.

La inhibición de la expresión de endosialina inhibe la interacción de endosialina con cualquier ligando de endosialina. Los ligandos de endosialina implicados en la invención son fibronectina, por ejemplo, fibronectina humana (SEQ ID N°:35) y colágeno.

Se pueden identificar agonistas y antagonistas de la interacción de endosialina con un ligando de endosialina. La identificación puede comprender poner en contacto endosialina con un compuesto de ensayo, poner en contacto el complejo endosialina-compuesto de ensayo con un ligando de endosialina, y medir de manera cuantificable la interacción de endosialina con el ligando en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Un incremento o disminución del nivel de interacción de endosialina con el ligando en presencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un agonista o antagonista, respectivamente, de la interacción de endosialina con el ligando.

La identificación puede comprender poner en contacto una célula que expresa endosialina con un compuesto de ensayo, poner en contacto la célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina, y medir de manera cuantificable la expresión o activación de las moléculas de integrina tales como integrina $\beta 1$, $\beta 2$, o $\beta 3$ en la célula en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Un incremento o disminución del nivel de expresión o activación de las moléculas de integrina en la célula en presencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un agonista o antagonista, respectivamente, de la interacción de endosialina con dicho ligando.

La identificación puede comprender poner en contacto una célula que expresa endosialina con un compuesto de ensayo, poner en contacto la célula que expresa endosialina con un ligando de endosialina, y medir de manera cuantificable la expresión o activación de MMPs tales como MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, o MMP-18 en la célula en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Un incremento o disminución del nivel de expresión o activación de las moléculas de MMP en la célula en presencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un agonista o antagonista, respectivamente, de la interacción de endosialina con dicho ligando.

En los ensayos, la endosialina puede estar unida a una membrana celular, preferiblemente una membrana celular de mamífero, un fragmento de una membrana celular, una bicapa lipídica artificial, o un soporte sólido adecuado. El ligando de endosialina puede ser una proteína de la matriz extracelular, que incluye, sin limitación, fibronectina o colágeno.

Una estrategia para generar compuestos de ensayo con una actividad biológica potencial hacia endosialina o las células que expresan endosialina, es decir, con una interacción potencial con endosialina, implica, pero sin limitación, cribar bibliotecas de fagos que producen péptidos de la cubierta del fago que se pueden cribar para identificar polipéptidos en una biblioteca que pueden servir potencialmente para inhibir la interacción entre endosialina y un ligando de endosialina.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para describir la invención con más detalle. Pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplo 1

Análisis mediante Inmunohistoquímica de la Expresión de Endosialina en Tejido Canceroso

5 Se mostró el uso de anticuerpos para detectar células que expresan endosialina mediante inmunohistoquímica de tejidos cancerosos. El anticuerpo anti-endosialina o IgG normal se aplicó a tejidos de cáncer colorrectal humano recién congelados a dos concentraciones (0,5 µg/mL y 2,5 µg/mL). La solución salina tamponada con fosfato [PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2)] + 1 % de albúmina de suero bovino sirvió como diluyente para los anticuerpos primarios. Los tejidos se incrustaron en medio Tissue-Tek® O.C.T., se congelaron en hielo seco, y se almacenaron en bolsas de plástico selladas por debajo de -70°C. Los tejidos se cortaron a aproximadamente 5 µm, y se fijaron durante 10 minutos en acetona a temperatura ambiente. Los portaobjetos se almacenaron por debajo de -70°C hasta la tinción. Justo antes de la tinción, los portaobjetos se fijaron durante 10 segundos en un 10% de formalina tamponada neutra.

15 Los criocortes se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS [0,15 M NaCl, pH 7,2]). La peroxidasa endógena se bloqueó incubando los portaobjetos con la disolución de peroxidasa proporcionada en el equipo Dako EnVision™ durante 5 minutos y lavando dos veces en PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2). A continuación, los portaobjetos se trataron con un bloqueador de proteínas diseñado para reducir la unión inespecífica durante 20 minutos. El bloqueador de proteínas se preparó como sigue: PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2); 0,5% de caseína; 1% de albúmina de suero bovino (BSA); y 1,5% de suero de cabra normal. Tras el bloqueo de proteínas, se aplicó el anticuerpo primario (artículo de ensayo M4, anticuerpo de control negativo, o nada [tampón solo como control de ensayo]) a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2), se trataron con el polímero anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa suministrado en el equipo Dako EnVision™ durante 30 minutos (polímero EnVision™ usado a la concentración proporcionada por el fabricante), se lavaron dos veces con PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2), y se trataron con la disolución de sustrato-cromógeno (DAB) suministrada en el equipo Dako EnVision™ durante 8 minutos. Todos los portaobjetos se lavaron en agua, se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se les colocó un cubreobjetos para la interpretación. Como se muestra, los vasos del tumor (Figura 1A) se tiñeron positivamente para endosialina mientras el corte en serie teñido con el anticuerpo de control de isotipo fue negativo (Figura 1B).

Ejemplo 2

Análisis de Inmunohistoquímica de la Expresión de Endosialina en Tejido Sano

30 Se mostró el uso de anticuerpos para detectar células que expresan endosialina mediante inmunohistoquímica de tejidos normales. Brevemente, las muestras de tejido normal se cortaron mediante criostato y se analizó la expresión de endosialina como se describió anteriormente. Los tejidos normales contuvieron muy pocos fibroblastos/células similares a dendritas que expresasen endosialina aunque no tan fuertemente u homogéneamente como se observó en los vasos dentro de los tumores (Figura 2A y B). Estas células son útiles para estudiar los efectos de la neovascularización, y se pueden aislar por la expresión génica para estudiar los perfiles de crecimiento, diferenciación, migración o identificación de características celulares. Se pueden estudiar *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* mediante el uso de métodos conocidos para los expertos en la técnica, así como los enumerados más adelante.

Ejemplo 3

Aislamiento y Enriquecimiento de Células que Expresan Endosialina

40 Para demostrar que las proteínas que se pueden unir a endosialina son una manera eficaz de enriquecer en células que expresan endosialina endoteliales o similares a fibroblastos, se cribaron células endoteliales microvasculares humanas (HMVECs) mediante el uso de un anticuerpo que se puede unir a endosialina para aislar una población enriquecida de células que expresan endosialina a partir de una mezcla inicial que contenía un 5-10% de células que expresan endosialina. Sin desear limitarse por el método o los reactivos específicos siguientes, este ejemplo demuestra el uso de los anticuerpos hacia endosialina que pueden aislar las células que expresan endosialina.

45 Brevemente, se revistieron placas de 96 pocillos en condiciones estériles con anticuerpo anti-Fcγ de IgG humana de cabra. A continuación, se añadieron 20 µg/ml de un anticuerpo M4 humano anti-endosialina a las placas y tres pocillos (A, B, C) como controles sin el anticuerpo y se incubó durante 1 hr a 4°C. Las HMVECs se recogieron de cultivos en placas de Petri de 10 cm con DPBS/EDTA en vez de tripsina para evitar cualquier daño a las membranas celulares, y así se dejaron intactas las proteínas de endosialina de la superficie celular. Las células mezcladas se colocaron en placas a dos concentraciones diferentes, 100.000 células/pocillo o 50.000 células/pocillo en las placas de 96 pocillos después de aspirar y lavar cualquier anticuerpo anti-endosialina sin unir. Las células se incubaron en las placas durante una hora a 4°C. Las placas se lavaron después con DPBS/FBS cuatro veces (hasta que los pocillos de control A, B, y C no mostraron células en ellos). La placa de 50.000 células/pocillo mostró muy pocas células, mientras los pocillos de 100.000 células/pocillo contuvieron cierto número de células unidas a la placa. Las células se incubaron después durante tres días en medios de crecimiento adecuados. Los pocillos de control B y C se recogieron de las placas de 100.000 células/pocillo para la inmunotinción. Se usó un colorante de calceína AM

para teñir las células para la visualización mediante el uso de un microscopio de fluorescencia Nikon® Eclipse TS100. Los cultivos cribados positivos se expandieron para el crecimiento y análisis posterior de una expresión de endosialina homogénea como se describe más adelante.

5 Para determinar adicionalmente la capacidad de aislar las células que expresan endosialina, se prepararon células HMVEC cribadas mediante un anticuerpo anti-endosialina y cultivos de HMVEC sin cribar para la inmunotinción mediante el uso de un anticuerpo fluorescente anti-endosialina o un anticuerpo fluorescente hacia α - β 1-integrina como control. Como se esperaba, más de un 90% de las células se tiñeron positivamente para α - β 1-integrina a partir de los cultivos cribados y sin cribar (no mostrado), mientras más de un 90% de las células se tiñeron positivamente para endosialina de los cultivos cribados, mientras solamente un 5-7% de las células se tiñeron positivamente para endosialina en los cultivos de HMVEC sin cribar. Estos datos demuestran la capacidad de aislar y enriquecer las células viables que expresan endosialina mediante el uso de proteínas de unión a endosialina tales como anticuerpos.

15 Como se muestra en la Figura 3, el cultivo cribado tuvo un número mucho mayor de células positivas para endosialina en comparación con el cultivo originario sin cribar, tal como se determina mediante inmunotinción por medio de un anticuerpo anti-endosialina seguido de un anticuerpo secundario conjugado fluorescente. El número de células de cada campo se determinó mediante microscopía óptica.

Ejemplo 4

Interacción de Endosialina con las Proteínas de la Matriz Extracelular

20 *Construcción de los plásmidos de expresión TEM1 y Fc-TEM-1.* Se usó una PCR para amplificar un fragmento de ADN que representa los aminoácidos 1-685 del marco de lectura abierto de TEM1 (GenBank n° AF279142) del ADN genómico LA1-5S. Los amplicones resultantes se digirieron con *EcoRI* y *XbaI* y se ligaron en pEF6-V5-HisA (Invitrogen). Para generar Fc-TEM-1, se fusionó la región extracelular de TEM1 al dominio Fc_γ de IgG2_b murino monomérico y se ligó en el vector derivado pEF6-EK-Mm-IgG2b-Fc_γ-ND que contenía una región de reconocimiento de enteroquinasa (DDDD) seguida por un dominio Fc_γ de IgG2_b murino (bisagra hasta CH3). Para prevenir la dimerización, los cuatro residuos de cisteína responsables de la unión mediante puentes disulfuro entre las cadenas pesadas se cambiaron a serina. La proteína de fusión monomérica secretada resultante consiste en el dominio extracelular completo de TEM1 y el Fc_γ de IgG2_b murino. La integridad de todas las secuencias de plásmidos se verificó mediante el uso del procedimiento químico Beckman® DTCS (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se obtuvieron datos en bruto con un secuenciador de ADN CEQ 8000 y se analizaron mediante el uso del programa informático VectorNTI® (Invitrogen).

35 *Purificación de Fc-TEM-1.* Las células CHO-TEM1-Fc_γ se cultivaron a una escala de 25 L en medio IS-CHO-CD (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), complementadas con L-glutamina 2 mM, Penicilina/Estreptomina 1X, 6 g/L de hidrolizado de soja y 2,2 g/L de bicarbonato sódico (Irvine Scientific), en una plataforma Wave20/50EH equipada con un Cellbag50® (GE Healthcare, Piscataway, NJ), hasta que la viabilidad del cultivo alcanzó un 50-70%. El medio extracelular acondicionado se aclaró mediante el uso de un sistema piloto de fibra hueca de mesa Flexstand® (GE Healthcare) equipado con un cartucho de fibra hueca de 0,2 μ m (GE Healthcare) hasta que quedaron 0,5 L de cultivo en el recipiente de retención. En este punto, la masa de células concentradas se lavó con 4 L de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Fosfato K 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2), para recuperar el líquido extracelular restante. Los 4 L de lavado se mezclaron con el suministro aclarado. El medio de cultivo aclarado se concentró después doce veces (29 L hasta 2,5 L); mediante el uso de un equipo de cartuchos de ultrafiltración Prep/Scale® Spiral Wound 2.5 ft² 100k en un soporte Prep/Scale® (Millipore, Billerica, MA), y se controló mediante una bomba peristáltica a una presión de entrada de 137,9 kPa, y una velocidad de recirculación de aproximadamente 400 mL/min. El suministro concentrado resultante se esterilizó mediante filtración por medio de filtros de botellas equipados con una membrana de 0,2 μ m (Nalgene). TEM1-Fc_γ se capturó mediante cromatografía de afinidad con proteína A, en una columna de 10x100 mm ProSep-vA® (Millipore), y se eluyó mediante la adición de 5 volúmenes de columna de tampón de elución (citrato 100 mM/acetato 10 mM de pH 3,0). El material eluido se dializó con tampón QA (Tris-Cl 20 mM de pH 8,0), y se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna de 5 mL HiTrap® Q-FF (GE Healthcare). Las proteínas unidas se lavaron con un tampón QB al 15% (Tris-Cl 20 mM, NaCl 1 M de pH 8,0), seguido de elución del Fc-TEM-1 unido mediante el uso de tampón QB al 35%. 50 Las proteínas eluidas se concentraron mediante ultra-filtración en un módulo de ultra-filtración a presión positiva Modelo 8400 (Millipore) equipado con una membrana de 100 kDa MWCO (Millipore), hasta un volumen final de aproximadamente 5 mL. El Fc-TEM-1 concentrado se purificó mediante cromatografía preparativa de exclusión por tamaños en una columna Sephacryl® S-300HR 26 x 60 (GE Healthcare) equilibrada con PBS. Las fracciones que contenían Fc-TEM-1 purificado se mezclaron, se concentraron hasta un intervalo nominal de 0,1-1 mg/mL mediante ultra-filtración con el uso de una membrana de 100 kDa MWCO y se almacenaron en alícuotas de un solo uso a -80°C.

60 Se cargó el Fc-TEM-1 purificado (2,9 μ g) en un gel de Bis-Tris del 4-12% (Invitrogen, Inc.), y se sometió a electroforesis en tampón de electroforesis MOPS (MOPS 50 mM, Tris 50 mM, SDS 3,5 mM, EDTA 1 mM de pH 7,7), durante 40 minutos. Para la tinción, el gel se fijó durante 15 minutos en disolución Fix (50% de metanol, 10% de ácido acético), se lavó dos veces durante 10 minutos en agua desionizada, y se tiñó durante al menos una hora

mediante el uso de una tinción de azul de Coomassie coloidal GelCode (Pierce). El gel se destiñó lavando repetidamente con agua desionizada.

5 Se usaron placas de 96 pocillos pre-revestidos con Fibronectina (FN), Colágeno I (Col I), Colágeno IV (Col IV), Laminina (LN) (BD Biosciences, San Diego CA), Vitronectina (VN), o Gelatina (Gel) (Chemicon Intl.) para estudiar la unión de Fc-TEM-1. La unión de TEM1 a Col I, Col IV, y FN no se debió a contaminantes en cantidades mínimas en la proteína purificada de plasma humano, ya que no se detectó ni Col I ni Col IV en FN mediante ELISA con anticuerpo anti-Col, ni se detectó FN en Col (datos no mostrados). Todas las placas se bloquearon con tampón de ensayo (0,5% de BSA, 0,5% de Tween-20 en PBS) durante 2 h antes de la adición de la proteína de fusión Fc-TEM-1, una endosialina soluble generada mediante fusión de la secuencia líder N-terminal y el dominio extracelular completo de endosialina a una cadena pesada gamma murina. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió el anticuerpo anti-IgG (H+L) humana de cabra-HRP (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante 1 h. El desarrollo de color se determinó mediante el uso del sustrato de peroxidasa SureBlue™ TMB (KPL, Gaithersburg, MD). Se usó BSA y un anticuerpo de control de isotipo humano como controles negativos. Fc-TEM-1 no se unió a BSA, ni tampoco el isotipo humano se unió a ninguna de las proteínas de ECM (datos no mostrados).

10 Como se muestra en la Figura 4A, el Fc-TEM1 se unió a fibronectina y colágeno I y IV de una manera dependiente de la dosis, aunque no se observó unión dentro del intervalo de dosis completo a LN o VN. De manera interesante, aunque Fc-TEM1 se unió a colágeno, no se observó una unión detectable a gelatina (colágeno desnaturalizado térmicamente). Ninguno de los cuatro anticuerpos IgG de isotipo murino ensayados se pudieron unir a ninguna de las proteínas de ECM, lo que descarta la posibilidad de que las interacciones estuvieran mediadas por el esqueleto Fc murino de la proteína de fusión Fc-TEM1 (datos no mostrados). Una proteína de fusión que contiene la cadena pesada gamma murina y solamente el dominio de lectina de endosialina se une también a FN (datos no mostrados).

20 Para confirmar la selectividad de la interacción de Fc-TEM1 y las proteínas de ECM, Fc-TEM1 se aplicó a placas de ELISA revestidas con diferentes proteínas purificadas. Se llevaron a cabo ELISAs específicos de antígeno revistiendo placas de ELISA TP Immunomini con 1 ug/ml de STEB (vacuna contra la enterotoxina B de Staphylococcus), 2 ug/ml de gamma globulina bovina, 2 ug/ml de antígeno de glicoproteína de 90 kD asociado a tumores expresado en la mayoría de las células de melanoma (TA90), 2 ug/ml de lisozima de huevo de gallina, dilución 1:500 de toxoide tetánico, 1% de BSA, 0,2 ug/ml de mesotelina humana, 2 ug/ml de ovalbúmina (OVA), 1 ug/ml de GM-CSF humano, 2 ug/ml de IgG de cabra, 2 ug/ml de IgG de ratón disuelta en tampón de revestimiento de bicarbonato (pH 9,6) (Sigma) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (que contenía un 0,5% de TWEEN-20), se bloquearon con tampón de ensayo 1x durante 2 horas a temperatura ambiente y se llevó a cabo el ELISA como se describió anteriormente. Como se muestra en la Figura 4B, Fc-TEM1 no se unió a ninguna de las proteínas ensayadas excepto el anti-Fc de ratón usado como control positivo.

Ejemplo 5

35 Inhibición de la Unión de TEM1 a Fibronectina Plasmática Humana

Se pre-revistieron placas de 96 pocillos con Fibronectina (FN), y se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-TEM-1 de bloquear la adhesión mediada por Fc-TEM-1 mediante ELISA. Brevemente, la placa revestida con FN se bloqueó con tampón de ensayo (0,5% de BSA, 0,5% de Tween-20 en PBS) durante 2 h antes de la adición de las proteínas de fusión. Fc-TEM-1 se pre-incubó durante 1 h a 4°C con los anticuerpos M4 (un anticuerpo anti-endosialina humanizado descrito como ES1 en la publicación de pat. de EE.UU. nº 20060239911), isotipo humano (HulgG), o anticuerpo anti-TEM-1 generado en conejos (RbtTEM1). M4 no se une a homólogos de especie de endosialina, con la excepción de primates no humanos. El epítipo de unión de M4 se ha cartografiado en el dominio de lectina extracelular de endosialina. El complejo proteína/anticuerpo se añadió a la placa revestida con FN y se dejó adherir durante 1 h a temperatura ambiente, en cuyo momento se lavaron las placas y se añadió el anticuerpo anti-IgG (H+L) humana de cabra-HRP (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante 1 h. El desarrollo de color se determinó mediante el uso del sustrato de peroxidasa SureBlue™ TMB (KPL, Gaithersburg, MD). Como se muestra en la Figura 6, M4 inhibió la unión de Fc-TEM1 a fibronectina, mientras un control inespecífico (HulgG) no inhibió la unión. RbtTEM1 también inhibió la unión de Fc-TEM1 a fibronectina (datos no mostrados).

50 Ejemplo 6

La Endosialina Actúa como Mediador en la Adhesión a Fibronectina

Se generaron células CHO-TEM1 que expresaban de manera estable endosialina (verificado mediante FACS con el anticuerpo M4; datos no mostrados). Las células CHO-K1 se mantuvieron en RPMI complementado con L-glutamina, 1% de aminoácidos esenciales mínimos, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, y 10% de FBS inactivado térmicamente (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células CHO-K1 (3E6) (ATCC, Manassas, VA) se sometieron a electroporación con 10 ug de ADN plasmídico linealizado en una cubeta de electroporación de 0,4 mm. Se administró un pulso de 170 V/1000 uF mediante el uso de un GENE PULSER (BioRad, Hercules, CA). Las células sometidas a electroporación se dejaron recuperar durante 24 horas, tras lo cual se seleccionaron los clones

resistentes a Blastocidina (5 ug/ml). La expresión de endosialina se verificó mediante FACS, y las células se clasificaron en función de una expresión elevada.

Las células ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) se lavaron y se suspendieron en PBS que contenía Mg^{2+}/Ca^{2+} , y se añadieron por cuadruplicado a una placa de 96 pocillos revestidos con Fibronectina y se dejaron adherir durante 1 h. Cuando se indica, las células se pre-incubaron con anticuerpo M4 (100 ug/mL) o isotipo humano (IgG) durante 1 h antes del inicio de los ensayos. Después de dejar que las células se adhieran, la placa se lavó 5 veces con PBS y se midió la viabilidad mediante el uso de CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI). La Figura 9B muestra que la sobreexpresión de endosialina da como resultado la unión celular incrementada a fibronectina, que se puede bloquear mediante inhibidores de endosialina tales como el anticuerpo M4, en contraste con controles tales como IgG inespecífica.

10 Ejemplo 7

Unión de Endosialina a Fibronectina y Fragmentos de Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína compleja grande que existe en forma de un dímero unido de manera covalente mediante un puente disulfuro al extremo C-terminal de la proteína (Ruoslahti *et al.* (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:7277-7281; Wierzbicka-Patynowski y Schwarzbauer (2003) *J. Cell Sci.*, 116:3269-3276; Magnusson y Mosher (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18:1363-1370). Se ha informado que los fragmentos de fibronectina derivados de la degradación enzimática o del corte y empalme alternativo están asociados a ciertos estados patológicos y poseen diferentes funciones biológicas (Magnusson y Mosher (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18:1363-1370; Labat-Robert (2002) *Semin. Cancer Biol.*, 12:187-195; Homandberg (1999) *Front Biosci.*, 4:D713-730).

Se estudió la capacidad de Fc-TEM-1 de unirse a diferentes fragmentos de fibronectina. Se diluyeron cantidades equimolares de proteínas en tampón de revestimiento (carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,4), se añadieron a una placa de ELISA (Greiner Bio-one, Monroe, NC) y se incubaron durante la noche a 4°C. Todas las placas se bloquearon con tampón de ensayo (0,5% de BSA, 0,5% de Tween-20 en PBS) durante 2 h antes de la adición de Fc-TEM-1. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió el anticuerpo anti-IgG (H+L) humana de cabra-HRP (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante 1 h. El desarrollo de color se determinó mediante el uso del sustrato de peroxidasa SureBlue™ TMB (KPL, Gaithersburg, MD). Para estudiar la integridad de las proteínas de fibronectina revestidas, se usó el anticuerpo policlonal de conejo dirigido hacia fibronectina (Ab FN) para detectar que todos los fragmentos de FN fueron reconocibles y se revistieron uniformemente.

La fibronectina de tamaño completo purificada de plasma humano y los fragmentos de FN de unión celular de 120 kDa se adquirieron de Chemicon Intl. (Temucula, CA), fragmentos proteolíticos de 30 kDa, 45 kDa, 70 kDa de Sigma (St. Louis, MO), y los fragmentos 2 y 4 de fibronectina humana recombinante (FN2 y FN4, respectivamente) de R&D Systems (Minneapolis, MN).

Como se muestra en la Figura 7A, Fc-TEM1 se une al fragmento de 70 kDa aminoterminal de FN y sus productos de escisión proteolítica (fragmentos de 45 kDa y 30 kDa). El grado de unión varió entre los diferentes fragmentos y fue menor del observado con FN completo. En contraste, Fc-TEM1 no se unió al fragmento de FN de 120 kDa o los fragmentos recombinantes Fn2 o Fn4. Es improbable que esta ausencia de unión se deba a un revestimiento o degradación irregular, ya que todos los fragmentos de FN se detectaron claramente mediante un anticuerpo policlonal anti-FN. Esto demuestra que el dominio de FN implicado en la interacción con endosialina reside en la porción aminoterminal de 70 kDa. Para determinar si la capacidad de unión reducida tras la digestión adicional del fragmento de 70 kDa indica que Fc-TEM1 se une a una región localizada en estrecha proximidad al sitio de escisión proteolítica o que TEM1 reconoce epítopos conformacionalmente dependientes en el extremo aminoterminal de FN que se altera tras la digestión adicional, se examinó la capacidad de Fc-TEM1 de unirse a formas reducidas de proteínas FN. Aunque el anticuerpo anti-FN fue capaz de reconocer el FN reducido, lo que indica un revestimiento equivalente, la unión de Fc-TEM1 se eliminó completamente tal como se muestra en la Figura 7B. De forma similar al FN completo, el anticuerpo M4 anti-endosialina bloqueó la unión de Fc-TEM1 al fragmento de 70 kDa de una manera dependiente de la dosis (Figura 7C), mientras un anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto (Figura 7D). Estos resultados indican que Fc-TEM1 reconoce epítopos conformacionalmente dependientes localizados en el extremo aminoterminal de FN que se pueden ver afectados tras la degradación proteolítica adicional.

Ejemplo 8

Asociación de fibronectina de la superficie celular con endosialina

Se generaron células CHO-TEM1 que expresaban de manera estable endosialina (verificado mediante FACS con el anticuerpo M4; datos no mostrados). Las células CHO-K1 se mantuvieron en RPMI complementado con L-glutamina, 1% de aminoácidos esenciales mínimos, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, y 10% de FBS inactivado térmicamente (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células CHO-K1 (3E6) (ATCC, Manassas, VA) se sometieron a electroporación con 10 ug de ADN plasmídico linealizado en una cubeta de electroporación de 0,4 mm. Se administró un pulso de 170 V/1000 uF mediante el uso de un GENE PULSER (BioRad, Hercules, CA). Las células sometidas a electroporación se dejaron recuperar durante 24 horas, tras lo cual se seleccionaron los clones resistentes a Blastocidina (5 ug/ml). La expresión de endosialina se verificó mediante FACS, y las células se

clasificaron en función de una expresión elevada.

El nivel de FN de la superficie celular se examinó mediante citometría de flujo en células CHO-K1 originarias y CHO-TEM1 mediante el uso de un anticuerpo anti-FN policlonal. Las células se recogieron en Tampón de Disociación de Células (Invitrogen, Carlsbad, CA), se lavaron, y se resuspendieron en PBS + 1% de FBS helado. Las células se incubaron durante 1 hora en hielo con el anticuerpo primario M4 (10 ug/ml), se lavaron, y se incubaron con anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado a FITC (Southern Biotech, Birmingham, AL) y se analizaron en un citómetro de flujo EASYCYTE (Guava Technologies, Hayward, CA). Se observaron constantemente niveles un 15-20% mayores de FN superficial en las células CHO-TEM1 en comparación con las células CHO-K1 (datos no mostrados). Se examinó la asociación de FN de la superficie celular con endosialina.

Mediante el uso de un anticuerpo anti-FN, se inmunoprecipitó FN de lisados de CHO-K1 y CHO-TEM1, seguido de transferencia de Western mediante el uso del mismo anticuerpo o un anticuerpo anti-TEM1 (M4). Las células (10E7) se lisaron en tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 1% de NP-40, 0,5% de desoxicolato sódico, NaCl 150 mM, 0,1% de dodecil sulfato sódico [SDS]) complementado con Mezcla de Inhibidores de Proteasas Mini Completa (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min para eliminar los residuos. Se lavaron esferas de Proteína G-Sefarosa 6 Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 3 veces con PBS y se capturó el anticuerpo anti-FN (1 ug) mediante balanceo suave a 4°C. Se pre-aclararon cantidades iguales de proteína por muestra mediante la adición de Proteína G sin unir. Después de 2 horas de incubación, la Proteína G se eliminó y el sobrenadante se añadió al complejo anticuerpo-Sefarosa y se incubó durante la noche a 4°C. Después de un lavado exhaustivo con tampón RIPA, la proteína unida se eliminó mediante ebullición durante 10 minutos en tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen) que contenía un 5% de β-mercaptoetanol. Las proteínas se separaron mediante el uso de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en un gel de Bis-Tris del 4-12% (Invitrogen) y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se llevó a cabo una inmunotransferencia mediante el uso de anticuerpos policlonales de conejo específicos de fibronectina (Abcam, Cambridge, MA) o endosialina (Morphotek, Inc., Exton, PA), se detectaron con un anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado a HRP, y se visualizaron mediante el uso de sustrato quimioluminiscente SUPERSIGNAL West Pico (Pierce, Rockford, IL). También se monitorizó la integridad y pureza de Fc-TEM1 soluble mediante transferencia de Western. La proteína (5 ug) se sometió a ebullición durante 5 min en Tampón de Muestra 4x NUPAGE LDS (Invitrogen) que contenía un 5% de β-mercaptoetanol, se sometió a electroforesis en un gel de Bis-Tris NUPAGE del 4-12% (Invitrogen), y se transfirió a una membrana de PVDF y se llevó a cabo la inmunotransferencia como se describió anteriormente.

Se descubrió que FN puede inmunoprecipitar la endosialina de lisados de CHO-TEM1 (datos no mostrados). En contraste, en los lisados celulares inmunoprecipitados con una IgG normal que no precipitó FN, no se pudo detectar endosialina (datos no mostrados). Al menos dos aproximaciones diferentes (ELISA y coimmunoprecipitación) proporcionan pruebas sólidas de la interacción de FN y endosialina. Se obtuvieron resultados similares mediante el uso de células HEK-293T que expresan de manera ectópica endosialina (datos no mostrados).

Ejemplo 9

Las células que Expresan Endosialina Cultivadas en MATRIGEL Forman Estructuras Similares a Telarañas

Aunque no se observaron diferencias de crecimiento o supervivencia entre las células CHO-K1 originarias y CHO-TEM1 cultivadas en una superficie de plástico, se observó una morfología drásticamente diferente cuando estas células se cultivaron en MATRIGEL. Las células CHO-K1 originarias crecieron en agrupamientos celulares aislados con protusiones mínimas después de 2 días de cultivo (Figura 8, paneles superiores), mientras las células CHO-TEM1 crecieron en agrupamientos que formaron una red similar a una telaraña (Figura 8, panel izquierdo inferior). Además, las células CHO-TEM1 dentro del agrupamiento exhibieron protusiones que alcanzaron otros agrupamientos (Fig. 8, panel derecho inferior). A lo largo del tiempo, las células CHO-TEM1, pero no las células CHO-K1, se acercaron entre sí para formar agrupamientos mayores (datos no mostrados).

Ejemplo 10

La Expresión de Endosialina Incrementa la Adhesión Celular a Fibronectina, y el Extremo N-terminal de 70 kDa o 30 kDa de Fibronectina

Para estudiar la adhesión a fragmentos de FN, se pre-revistieron cantidades equimolares de fragmentos de proteínas durante la noche y después se bloquearon durante 2 h con PBS que contenía 10 mg/mL de BSA. MATRIGEL sirvió como control positivo. Las células CHO-K1 o CHO-TEM1 ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) recogidas en tampón de disociación celular se lavaron y se suspendieron en PBS que contenía Mg^{2+}/Ca^{2+} , y se añadieron por cuadruplicado a un Equipo de Matriz de Adhesión de Células ECM (Millipore) o se colocaron en placas revestidas individualmente con FN, LN, Gel, y Col I (BD Biosciences) y se dejaron adherir durante 1 h. Tras la incubación, cada pocillo se lavó 5 veces con PBS y se midió la viabilidad mediante el uso de CellTiter-Glo®. Donde se indica, las células se pre-incubaron con anticuerpo durante 1 hora antes del inicio del ensayo. Como se muestra en la Figura 9A, el número de células CHO-TEM1 adherentes fue 6 veces mayor que el número de células CHO-K1 originarias en los pocillos revestidos con FN. No se observaron diferencias significativas en la adhesión entre CHO-K1 y CHO-

TEM1 en las superficies revestidas con laminina o vitronectina, aunque la adhesión a colágenos y tenascina fue demasiado débil para calcular ninguna diferencia valiosa (Figura 9A). El pretratamiento de las células CHO-TEM1 con el anticuerpo M4 dio como resultado una reducción del 50% de la adhesión celular dependiente de TEM1-FN, mientras el anticuerpo de control de IgG no tuvo ningún efecto (Figura 9B). El tratamiento con el anticuerpo M4 no afectó a la adhesión celular dependiente de FN, independiente de endosialina (adhesión inicial) de las células CHO-K1 originarias.

Las placas se prerrevistieron con cantidades equimolares de FN completo, fragmentos proteolíticos de FN, y MATRIGEL. Las células CHO-TEM1 mostraron una adhesión incrementada de 3 a 5 veces a FN, fragmentos de 70 kDa, y 30 kDa en comparación con las células CHO-K1 originarias, mientras no se observó una adhesión significativa a fragmentos de 45 kDa o Fn2. Las células CHO-TEM1 se unieron a MATRIGEL cinco veces mejor que CHO-K1 (Figura 9C). Estos datos indican que la endosialina aumenta la adhesión de las células a las matrices extracelulares y que el extremo aminoterminal de FN está implicado en estas interacciones.

Ejemplo 11

Endosialina se une a Colágeno I y M4 Inhibe Esta Unión

Se usó una placa de 96 pocillos pre-revestidos con Colágeno I para estudiar la capacidad de M4 de bloquear la unión de Fc-TEM-1. La placa se bloqueó con tampón de ensayo (0,5% de BSA, 0,5% de Tween-20 en PBS) durante 2 h antes de la adición de la proteína a la concentración indicada ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Se pre-incubó Fc-TEM-1 durante 1 h a 4°C con los anticuerpos M4 o isotipo humano (IgG humana). El complejo proteína/anticuerpo se añadió después a la placa revestida con Col I y se dejó adherir durante 1 h a temperatura ambiente, en cuyo momento se lavaron las placas y se añadió el anticuerpo anti-IgG (H+L) humana de cabra-HRP (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante 1 h. El desarrollo de color se determinó mediante el uso del sustrato de peroxidasa SureBlue™ TMB (KPL, Gaithersburg, MD). Como se muestra en la Figura 10, la sobre-expresión de endosialina da como resultado una unión celular incrementada a COL I, que se puede bloquear mediante inhibidores de endosialina tales como M4, en contraste con controles tales como IgG inespecífica. RbTEM1 también inhibió la unión de Fc-TEM1 a Col I (datos no mostrados).

Ejemplo 12

La Endosialina Incrementa la Adhesión Celular a Colágeno

Se lavaron células CHO-K1 o CHO-TEM1 ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) y se suspendieron en PBS que contenía $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, y se añadieron por cuadruplicado a una placa de 96 pocillos revestidos con Colágeno I y se dejaron adherir durante los puntos de tiempo indicados. Después de dejar que las células se adhirieran, la placa se lavó 5 veces con PBS y se midió la viabilidad mediante el uso de CellTiter-Glo®. Como se muestra en la Figura 11, la sobre-expresión de endosialina da como resultado una unión celular incrementada a COL I.

Ejemplo 13

Ensayo de Migración Celular

Se usó el sistema de invasión tumoral BD BioCoat™ (BD Bioscience) e insertos de cultivo celular de fibronectina humana (BD Bioscience) para estudiar la migración de células mediada por TEM1. Las células se recogieron con tampón de disociación no enzimática de células y se diluyeron a una concentración de 4×10^5 células/ml en medio de crecimiento complementado con un 2% de suero bovino fetal (FBS), y se añadieron 500 μl de suspensión de células a la cámara superior del inserto de membrana. Para crear un gradiente, se añadió medio de crecimiento que contenía un 20% de FBS a la cámara inferior. Las células se incubaron durante 48 horas, tras lo cual el inserto se retiró y las células que habían migrado a través de la membrana revestida se contaron mediante el uso de CELLTITER-GLO (Promega). Las células se pretrataron con anticuerpo tal como se indica en la descripción de la Figura 12 y se estudió la migración en presencia constante de anticuerpo. Para examinar la formación de túbulos en MATRIGEL, se añadieron células (8×10^4 células/pocillo) a una placa de 96 pocillos revestidos con MATRIGEL (BD Bioscience), se incubaron durante la noche y se fotografiaron a un aumento de 200-400x.

Como se muestra en la Figura 12A, las células CHO-K1 exhibieron una migración celular moderada, mientras las células CHO-TEM1 mostraron una migración incrementada >10 veces. El tratamiento con el anticuerpo M4, pero no con la IgG de control, eliminó la migración de las células CHO-TEM1. Se observaron resultados similares en los experimentos de migración mediante el uso de cámaras Transwell revestidas con FN (Figura 12B).

Ejemplo 14

La Endosialina Incrementa la Actividad de MMP-9

Se han demostrado que endosialina, MMP-2, y COL IV se localizan en áreas de tejido caracterizadas por protusiones similares a dedos de las prolongaciones angiogénicas tempranas (Virgintino *et al.* (2007) *Angiogenesis*, 10:35-45). Para estudiar la actividad de MMP, se sembraron células en una placa de 6 pocillos y se les privó de

suero durante 48 h. Se recogió el sobrenadante del cultivo y se aclaró mediante centrifugación (13.000 rpm, 15 min.) a 4°C para eliminar cualquier resto. Se sometieron cantidades iguales de proteína a zimografía con gelatina y caseína en condiciones no reductoras (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se usaron controles positivos de MMP-2 y 9 humano (Chemicon, International) para indicar la migración de MMP-2 y MMP-9 y se usaron como referencia para los sobrenadantes de CHOK1 y CHO-TEM-1. Como se muestra en la Figura 13, la actividad de MMP-9 se incrementó significativamente en las células CHO-TEM1 en comparación con las células CHO-K1 originarias. La actividad de MMP-9 incrementada se correlacionó con la secreción incrementada de la proteína MMP-9 en el sobrenadante de las células CHO-TEM1 tal como se midió mediante un ELISA específico de MMP (datos no mostrados). Estos datos indican que la secreción inducida de MMP-9 contribuye a la capacidad de migración incrementada de las células CHO-TEM1 a través de MATRIGEL y cámaras Transwell revestidas con FN demostrada en la presente memoria.

Ejemplo 15

La Endosialina incrementa la Actividad de β -integrina

Las integrinas (p.ej., $\alpha\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$) son receptores bien caracterizados que median en la adhesión celular dependiente de FN (Wierzbicka-Patynowski y Schwarzbauer 2003; Magnusson y Mosher 1998). Además, se ha descrito funcionalmente un receptor celular sin identificar que se une a la región de 70 kDa N-terminal de FN (McKeown-Longo y Mosher (1983) *J. Cell Biol.*, 97:466-472) y es necesario para exponer el sitio de unión críptico a integrina (motivo RGD) del FN soluble implicado en las interacciones FN-integrina y FN-FN (Tomasini-Johansson *et al.* (2006) *Matrix Biol.*, 25:282-293; McKeown-Longo y Mosher (1985) *J. Cell Biol.*, 100:364-374). Se identifica endosialina en la presente memoria como un receptor nuevo que interacciona con la región de FN de 70 kDa N-terminal y aumenta la adhesión celular dependiente de FN. La unión de FN incrementada medida en estos sistemas celulares *in vitro* podría ser el resultado de la interacción secuencial con endosialina e integrinas.

Se transfectaron células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) con un vector que expresaba endosialina o un cADN simulado. Se confirmó que las células expresaban endosialina en la superficie celular (293TEM1), mientras las transfectadas con la molécula simulada (293T) no la expresaban. Las células se ensayaron con respecto a la capacidad de estimular la expresión y actividad de integrinas en presencia del anticuerpo M4. La Figura 14B muestra que la sobre-expresión de endosialina da como resultado una actividad incrementada de integrina $\beta 1$ respecto de las células de control. La Figura 14A muestra que la expresión de integrina $\beta 1$ en la superficie celular no cambia. El tratamiento de las células con el inhibidor de endosialina M4 dio como resultado una actividad inhibida de integrinas, mientras no se observó ningún efecto sobre los niveles de la superficie celular (Figura 14B). Aunque no se desea limitarse a ninguna teoría, la interacción entre endosialina y el fragmento de 70 kDa N-terminal de FN soluble puede ser responsable de iniciar el ensamblaje de FN hasta una forma multimérica de afinidad elevada capaz de unirse a las integrinas.

Ejemplo 16

M4.1 reconoce TEM-1 humano sin reducir, pero no TEM-1 murino

Se cultivaron células CHO-TEM-1, células 2H11 de ratón, células CHO-K1 originarias, células NS0 de ratón, y células MS1 de ratón en RPMI1640 completo (RPMI1640; piruvato sódico; aminoácidos no esenciales; L-glutamina, y FBS; Invitrogen Corp.). Se cultivaron pericitos primarios humanos en Medio de Pericitos (500 ml de medio basal (n° de cat. 1201), 10 ml (2%) de suero bovino fetal (FBS, n° de cat. 0025), 5 ml de suplemento de crecimiento de pericitos (PGS, n° de cat. 1252) y 5 ml de disolución de penicilina/estreptomina (P/S, n° de cat. 0503); Invitrogen Corp.). Las células se cultivaron a 37°C y un 5% de CO₂ en un incubador humidificado. Las células se desprendieron con TrypLE™ Select (Invitrogen Corp., n° de catálogo 12563-011), se lavaron y se contaron. Las células se lisaron a 2×10^7 células en tampón de lisis RIPA que contenía inhibidores de proteasas y se incubaron en hielo durante 10 minutos. El material insoluble se sedimentó a 10.000xG durante 10 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Se mezclaron alícuotas con un volumen igual de tampón de carga de proteínas 2X con o sin un 10% de 2-mercaptoetanol (agente reductor). Se cargaron 15 μ L ($1,5 \times 10^5$ células) de lisado en un gel de SDS-PAGE de un 4-12% de Bis/Tris de 15 pocillos y se sometieron a electroforesis durante 30 minutos a 200 V en tampón de electroforesis MES. El gel se electrotransfirió a PVDF, después se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con balanceo en un 5% de leche-TBST (5% de M-TBST). Las transferencias de M4.1 se analizaron con una sonda de M4.1 en un 5% de M-TBST a 3,3 μ g/mL durante la noche a 4°C.

Las transferencias con anticuerpo policlonal anti-tem-1 de conejo se analizaron con sonda a una dilución 1:300 (4,5 mg/ml de lote de reserva n°: NB487-76) de anticuerpo en un 5% de M-TBST durante la noche a 4°C. El anticuerpo M4.1, como el anticuerpo M4, es un anticuerpo humanizado hacia endosialina humana. Las membranas se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada una con 30 mL de TBST a temperatura ambiente. Se diluyó anti-IgG (H+L) humana de cabra conjugado a HRP (Jackson Immuno, reserva de 1 mg/mL) 1:20.000 en un 5% de M-TBST como anticuerpo secundario para analizar las transferencias de M4.1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se usó anticuerpo secundario anti-(H+L) de conejo de cabra conjugado a HRP para analizar las transferencias de anti-TEM-1 policlonal durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada una con 30 mL de TBST a temperatura ambiente. La señal se detectó mediante quimioluminiscencia mediante el uso del

sistema de detección Femto Western Blot (Pierce) de acuerdo con el manual.

5 Como se ilustra en la Figura 15, M4.1 reconoce TEM-1 humana sin reducir en células CHO-TEM-1 y pericitos primarios humanos pero no TEM-1 murino (SEQ ID N°:2) en células 2H11 de ratón (Figura 15). El anticuerpo policlonal de conejo hacia TEM-1 humano (rabPAb TEM-1) reconoce TEM-1 humano en células CHO-TEM-1 y pericitos humanos, pero también TEM-1 murino en células 2H11 de ratón. Ni M4.1 ni rabPAb TEM-1 reaccionó hacia los lisados de células CHO-K1 originarias o células NS0 y MS1 de ratón debido a la ausencia de expresión de TEM-1 en estas células. Solamente rabPAb TEM-1 reaccionó con TEM-1 humano reducido, aunque en menor grado en comparación con TEM-1 sin reducir.

10 La presente invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente, sino que es susceptible de variaciones y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Morphotek, Inc. Zhou, Yuhong Tomkowicz, Brian Grasso, Luigi Nicolaidis, Nicholas Sass, Philip M.
 - <120> Métodos para inhibir la unión de endosialina a ligandos
 - <130> MOR-0727
 - 5 <150> US 60/910.362
 - <151> 05-04-2007
 - <150> US 60/980.026
 - <151> 15-10-2007
 - <160> 35
 - 10 <170> Patent In version 3.3
 - <210> 1
 - <211> 2660
 - <212> ADN
 - <213> Mus musculus
 - 15 <400> 1
- ```

gtcaagagca gcggcaggcc cgagccgggc cagtcggggg gcgtcgcgat gctgctgcgc 60
ctgctgctgg cctgggtggc cgcggtgcc gactgggcc aggtcccctg gacgccggag 120
cctcgagccg cgtgcggccc cagcagctgc tacgcgctct tccccggcg ccgcacattc 180
ctggaagctt ggcgggctg ccgcgaattg gggggcaacc tggccacacc gcggaccca 240
gaggaggccc agcgtgtgga cagcctggtg ggggtcgggc cggccaacgg gctgctatgg 300
attgggttgc agcggcaggc taggcaatgc cagccgcagc gccactgcg gggcttcata 360
tggaccacgg gagaccagga caccgccttc accaactggg cccagccggc tacggaagga 420
ccctgccag cccagcgtg tgcagccctt gaggccagcg gagagcatcg ctggctcga 480
ggctcgtgca cactggctgt cgatggctac ctctgccagt ttggttttga gggcgcctgc 540
cctgccttgc cgcttgaggt ggtcaggcc ggtcccgtg tctacaccac acccttcaac 600
ctggtttcca gcgagttcga atggctgcc ttggctccg tggcagctgt gcagtgcaa 660
gctggcaggg gagcttctct gctgtgcgtg aaacagcctt caggtggcgt gggctggtcc 720
cagactggcc cgcttgccc agggactggc tgtggtcctg acaatggggg ttgcgaacat 780
gagtgtgtgg aagaggtgga cgtgctgtg tctgcccgt gcagtgaagg cttccgtcta 840
gcagcagatg ggcacagttg tgaagacccc tgtgccagg cccctgtga gcagcagtg 900
gaacctggag ggccacaagg ctatagctgc cactgtcgc ttggcttccg gccagctgag 960

```

ES 2 452 929 T3

gatgatccac accgctgcgt ggacacggat gagtgccaga ttgctggtgt gtgccagcag 1020  
atgtgtgtca actatgttgg tggctttgag tgttactgca gcgaggggtca cgagcttgag 1080  
gcagatggta tcagctgtag ccctgcagga gccatgggtg cccaggcttc ccaggatctc 1140  
agagatgagt tgctggatga tggagaagaa ggggaggatg aagaggagcc ctgggaggac 1200  
tttgatggca cctggacaga ggaacagggg atcctatggc tggcacctac acatccacct 1260  
gactttggcc tgcctatag gcccaacttc ccacaggatg gagagcctca gagattgcac 1320  
ctggagccta cctggccacc cccacttagt gccccaggg gccctacca ctctcagt 1380  
gtgtctgcca cacggcccat ggtgatctct gccactcgac ccacactacc ttctgcccac 1440  
aagacctctg ttatttcage tacacgccc aacctgagcc ctgtccacc acctgcatg 1500  
gcccctgcca cacctccagc tgtgttctct gagcaccaga tccccaaat caaggccaat 1560  
tatccagacc tgccttttgg ccacaagcct gggataacct cggccactca cccagcacgg 1620  
tctctccgt accagcccc cattatctca accaactatc cccaagtctt cctccccac 1680  
caggccccta tgtctccaga taccacact atcacttatt tgcctccagt cccccctac 1740  
cttgatcctg gggataccac ttctaaagcc catcaacacc ctttgctccc agatgctcca 1800  
ggatcagaa cccaggcccc ccagctttct gtctcagctc tccagcccc tcttctacc 1860  
aactccaggt cttctgtcca tgaactcct gtgcctgctg ccaaccagcc cccagccttc 1920  
ccttctctc cctcccccc tcagaggccc actaaccaga cctcatctat cagcctaca 1980  
cattctatt ccagagcccc tctagtccca aggaaggag ttcccagtcc caaatcagt 2040  
ccacagctgc cctcggtgcc ctccacagca gctccaacag ccctggcaga gtcaggctt 2100  
gcaggccaaa gccaaagga tgaccgctgg ctgctggtgg cactcctggg gccaacatgt 2160  
gtcttcttgg tgggtgctgt tgcctgggc attgtgtact gcactcgtg ttggtcccac 2220  
gcacccaaca agcggatcac ggactgctat cgtgggtca cacatgctgg gaacaagagc 2280  
tcaacagaac ccattgcccc cagaggcagc cttacagggg tacagacctg tagaaccagt 2340  
gtgtgatggg gtgcagatgc ccctttgtgg gatagaagaa aaggacttgc tttggacaca 2400  
tggctgagac cacaccaagg acttatgggg gctgccagc tgacagagga gtttctgtc 2460  
tttgagccca gcatccatgg caaaggacac accaggactc caggacctca aggggtgggt 2520  
gctgggatct tctccaataa atggggtgcc aacctaccc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2580  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2660

<210> 2  
<211> 765  
<212> PRT  
5 <213> Mus musculus  
<400> 2

ES 2 452 929 T3

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

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

Ser Cys Tyr Ala Leu Phe Pro Arg Arg Arg Thr Phe Leu Glu Ala Trp  
 35 40 45

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

Glu Glu Ala Gln Arg Val Asp Ser Leu Val Gly Val Gly Pro Ala Asn  
 65 70 75 80

Gly Leu Leu Trp Ile Gly Leu Gln Arg Gln Ala Arg Gln Cys Gln Pro  
 85 90 95

Gln Arg Pro Leu Arg Gly Phe Ile Trp Thr Thr Gly Asp Gln Asp Thr  
 100 105 110

Ala Phe Thr Asn Trp Ala Gln Pro Ala Thr Glu Gly Pro Cys Pro Ala  
 115 120 125

Gln Arg Cys Ala Ala Leu Glu Ala Ser Gly Glu His Arg Trp Leu Glu  
 130 135 140

Gly Ser Cys Thr Leu Ala Val Asp Gly Tyr Leu Cys Gln Phe Gly Phe  
 145 150 155 160

Glu Gly Ala Cys Pro Ala Leu Pro Leu Glu Val Gly Gln Ala Gly Pro  
 165 170 175

Ala Val Tyr Thr Thr Pro Phe Asn Leu Val Ser Ser Glu Phe Glu Trp  
 180 185 190

Leu Pro Phe Gly Ser Val Ala Ala Val Gln Cys Gln Ala Gly Arg Gly  
 195 200 205

Ala Ser Leu Leu Cys Val Lys Gln Pro Ser Gly Gly Val Gly Trp Ser  
 210 215 220

ES 2 452 929 T3

Gln Thr Gly Pro Leu Cys Pro Gly Thr Gly Cys Gly Pro Asp Asn Gly  
 225 230 235 240

Gly Cys Glu His Glu Cys Val Glu Glu Val Asp Gly Ala Val Ser Cys  
 245 250 255

Arg Cys Ser Glu Gly Phe Arg Leu Ala Ala Asp Gly His Ser Cys Glu  
 260 265 270

Asp Pro Cys Ala Gln Ala Pro Cys Glu Gln Gln Cys Glu Pro Gly Gly  
 275 280 285

Pro Gln Gly Tyr Ser Cys His Cys Arg Leu Gly Phe Arg Pro Ala Glu  
 290 295 300

Asp Asp Pro His Arg Cys Val Asp Thr Asp Glu Cys Gln Ile Ala Gly  
 305 310 315 320

Val Cys Gln Gln Met Cys Val Asn Tyr Val Gly Gly Phe Glu Cys Tyr  
 325 330 335

Cys Ser Glu Gly His Glu Leu Glu Ala Asp Gly Ile Ser Cys Ser Pro  
 340 345 350

Ala Gly Ala Met Gly Ala Gln Ala Ser Gln Asp Leu Arg Asp Glu Leu  
 355 360 365

Leu Asp Asp Gly Glu Glu Gly Glu Asp Glu Glu Glu Pro Trp Glu Asp  
 370 375 380

Phe Asp Gly Thr Trp Thr Glu Glu Gln Gly Ile Leu Trp Leu Ala Pro  
 385 390 395 400

Thr His Pro Pro Asp Phe Gly Leu Pro Tyr Arg Pro Asn Phe Pro Gln  
 405 410 415

Asp Gly Glu Pro Gln Arg Leu His Leu Glu Pro Thr Trp Pro Pro Pro  
 420 425 430

Leu Ser Ala Pro Arg Gly Pro Tyr His Ser Ser Val Val Ser Ala Thr  
 435 440 445

Arg Pro Met Val Ile Ser Ala Thr Arg Pro Thr Leu Pro Ser Ala His  
 450 455 460

Lys Thr Ser Val Ile Ser Ala Thr Arg Pro Pro Leu Ser Pro Val His



ES 2 452 929 T3

465                                 470                                 475                                 480

Pro Pro Ala Met Ala Pro Ala Thr Pro Pro Ala Val Phe Ser Glu His  
                                             485                                 490                                 495

Gln Ile Pro Lys Ile Lys Ala Asn Tyr Pro Asp Leu Pro Phe Gly His  
                                             500                                 505                                 510

Lys Pro Gly Ile Thr Ser Ala Thr His Pro Ala Arg Ser Pro Pro Tyr  
                                             515                                 520                                 525

Gln Pro Pro Ile Ile Ser Thr Asn Tyr Pro Gln Val Phe Pro Pro His  
                                             530                                 535                                 540

Gln Ala Pro Met Ser Pro Asp Thr His Thr Ile Thr Tyr Leu Pro Pro  
 545                                              550                                 555                                 560

Val Pro Pro His Leu Asp Pro Gly Asp Thr Thr Ser Lys Ala His Gln  
                                             565                                 570                                 575

His Pro Leu Leu Pro Asp Ala Pro Gly Ile Arg Thr Gln Ala Pro Gln  
                                             580                                 585                                 590

Leu Ser Val Ser Ala Leu Gln Pro Pro Leu Pro Thr Asn Ser Arg Ser  
                                             595                                 600                                 605

Ser Val His Glu Thr Pro Val Pro Ala Ala Asn Gln Pro Pro Ala Phe  
 610                                              615                                 620

Pro Ser Ser Pro Leu Pro Pro Gln Arg Pro Thr Asn Gln Thr Ser Ser  
 625                                              630                                 635                                 640

Ile Ser Pro Thr His Ser Tyr Ser Arg Ala Pro Leu Val Pro Arg Glu  
                                             645                                 650                                 655

Gly Val Pro Ser Pro Lys Ser Val Pro Gln Leu Pro Ser Val Pro Ser  
                                             660                                 665                                 670

Thr Ala Ala Pro Thr Ala Leu Ala Glu Ser Gly Leu Ala Gly Gln Ser  
                                             675                                 680                                 685

Gln Arg Asp Asp Arg Trp Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Pro Thr Cys  
 690                                              695                                 700

Val Phe Leu Val Val Leu Leu Ala Leu Gly Ile Val Tyr Cys Thr Arg  
 705                                              710                                 715                                 720

ES 2 452 929 T3

Cys Gly Ser His Ala Pro Asn Lys Arg Ile Thr Asp Cys Tyr Arg Trp  
 725 730 735

Val Thr His Ala Gly Asn Lys Ser Ser Thr Glu Pro Met Pro Pro Arg  
 740 745 750

Gly Ser Leu Thr Gly Val Gln Thr Cys Arg Thr Ser Val  
 755 760 765

<210> 3  
 <211> 2576  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3  
 agtccggggg catcgcgatg ctgctgcgcc tgttgetggc ctgggcggcc gcagggccca 60  
 cactgggcca ggaccctggt gctgctgagc cccgtgccc ctgcggcccc agcagctgct 120  
 acgctctctt cccacggcgc cgcaccttcc tggaggcctg gcgggcctgc cgcgagctgg 180  
 ggggcgacct ggccactcct cggaccccc aggaggccca gcgtgtggac agcctggtgg 240  
 gtgcgggccc agccagccgg ctgctgtgga tcgggctgca gcggcaggcc cggcaatgcc 300  
 agctgcagcg cccactgccc ggcttcacgt ggaccacagg ggaccaggac acggctttca 360  
 ccaactgggc ccagccagcc tctggaggcc cctgcccggc ccagcgtgt gtggccctgg 420  
 aggcaagtgg cgagcaccgc tggctggagg gctcgtgcac gctggctgtc gacggctacc 480  
 tgtgccagtt tggttcgag ggcgcctgcc cggcgtgca agatgaggcg ggccaggccg 540  
 gccagccgt gtataccacg ccttccacc tggctccac agagtttgag tggctgccct 600  
 tcggctctgt ggccgctgtg cagtgccagg ctggcagggg agcctctctg ctctgcgtga 660  
 agcagcctga gggaggtgtg ggctggcacc gggctggccc cctgtgcctg gggactggct 720  
 gcagccctga caacgggggc tgcgaacacg aatgtgtgga ggaggtggat ggtcacggtg 780  
 cctgccgctg cactgagggc ttccggctgg cagcagacgg gcgcagttgc gaggaccct 840  
 gtgccaggc tccgtgagag cagcagtggt agcccgtgg gccacaaggc tacagctgcc 900  
 actgtgcctt gggtttccgg ccagcggagg atgatccgca ccgctgtgtg gacacagatg 960  
 agtgccagat tgccgggtgtg tgccagcaga tgtgtgtcaa ctacgttggg ggcttcgagt 1020  
 gttattgtag cgaggacat gagctggagg ctgatggcat cagctgcagc cctgcagggg 1080  
 ccatgggtgc ccaggcttcc caggacctcg gagatgagtt gctggatgac ggggaggatg 1140  
 aggaagatga agacgagccc tggaggcct tcaacggtgg ctggacggag atgcctggga 1200  
 tcctgtggat ggagcctacg cagccgctg actttgccct ggcctataga ccgagcttcc 1260

ES 2 452 929 T3

cagaggacag agagccacag atacctacc cggagcccac ctggccaccc ccgctcagtg 1320  
ccccagggt cccctaccac tcctcagtgc tctccgtcac ccggcctgtg gtggtctctg 1380  
ccacgcatcc cacactgect tctgcccacc agcctcctgt gatccctgcc acacaccag 1440  
ctttgtcccg tgaccaccag atccccgtga tcgcagccaa ctatccagat ctgccttctg 1500  
cctaccaacc cggatttctc tctgtctctc attcagcaca gcctcctgcc caccagcccc 1560  
ctatgatctc aaccaaatat cgggagctct tcctgccc aagtccccc atgtttccag 1620  
acaccgggt cgctggcacc cagaccacca ctcatctgcc tggaaatcca cctaaccatg 1680  
cccctctggt caccaccctc ggtgcccagc taccctca agccccagat gcccttgcc 1740  
tcagaacca ggccaccag cttccatta tcccactgc ccagccctct ctgaccacca 1800  
cctccaggtc ccctgtgtct cctgcccata aatctctgt gcctgctgcc acccagcccg 1860  
cagccctccc caccctctg cctctcaga gcccactaa ccagacctca cccatcagcc 1920  
ctacacatcc ccattccaaa gcccccaaa tccaagga agatggcccc agtccaagt 1980  
tggccctgtg gctgccctca ccagctcca cagcagcccc aacagccctg ggggaggctg 2040  
gtcttgccga gcacagccag agggatgacc ggtggctgct ggtggcactc ctggtgcca 2100  
cgtgtgtctt tttggtggtc ctgctgca tgggcatcgt gtactgcacc cgtgtggcc 2160  
cccatgcacc caacaagcgc atcactgact gctatcgtg ggtcatccat gctgggagca 2220  
agagcccaac agaaccatg cccccaggg gcagcctcac aggggtgcag acctgcagaa 2280  
ccagcgtgtg atggggtgca gacccccctc atggagtatg gggcgtgga cacatggccg 2340  
gggctgcacc agggaccat gggggtgcc cagctggaca gatggcttcc tgctccccag 2400  
gcccagccag ggtcctctct caaccactag acttgctct caggaactct gcttctggc 2460  
ccagcgtctg tgaccaagga tacacaaag cccttaagac ctcagggggc ggtgctggg 2520  
gtcttctcca ataatgggg tgtcaacctt acccaaggaa aaaaaaaaa aaaaaa 2576

<210> 4  
<211> 757  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens

<400> 4  
Met Leu Leu Arg Leu Leu Leu Ala Trp Ala Ala Ala Gly Pro Thr Leu  
1 5 10 15

Gly Gln Asp Pro Trp Ala Ala Glu Pro Arg Ala Ala Cys Gly Pro Ser  
20 25 30

ES 2 452 929 T3

Ser Cys Tyr Ala Leu Phe Pro Arg Arg Arg Thr Phe Leu Glu Ala Trp  
 35 40 45

Arg Ala Cys Arg Glu Leu Gly Gly Asp Leu Ala Thr Pro Arg Thr Pro  
 50 55 60

Glu Glu Ala Gln Arg Val Asp Ser Leu Val Gly Ala Gly Pro Ala Ser  
 65 70 75 80

Arg Leu Leu Trp Ile Gly Leu Gln Arg Gln Ala Arg Gln Cys Gln Leu  
 85 90 95

Gln Arg Pro Leu Arg Gly Phe Thr Trp Thr Thr Gly Asp Gln Asp Thr  
 100 105 110

Ala Phe Thr Asn Trp Ala Gln Pro Ala Ser Gly Gly Pro Cys Pro Ala  
 115 120 125

Gln Arg Cys Val Ala Leu Glu Ala Ser Gly Glu His Arg Trp Leu Glu  
 130 135 140

Gly Ser Cys Thr Leu Ala Val Asp Gly Tyr Leu Cys Gln Phe Gly Phe  
 145 150 155 160

Glu Gly Ala Cys Pro Ala Leu Gln Asp Glu Ala Gly Gln Ala Gly Pro  
 165 170 175

Ala Val Tyr Thr Thr Pro Phe His Leu Val Ser Thr Glu Phe Glu Trp  
 180 185 190

Leu Pro Phe Gly Ser Val Ala Ala Val Gln Cys Gln Ala Gly Arg Gly  
 195 200 205

Ala Ser Leu Leu Cys Val Lys Gln Pro Glu Gly Gly Val Gly Trp Ser  
 210 215 220

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

Gly Cys Glu His Glu Cys Val Glu Glu Val Asp Gly His Val Ser Cys  
 245 250 255

Arg Cys Thr Glu Gly Phe Arg Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Cys Glu  
 260 265 270

Asp Pro Cys Ala Gln Ala Pro Cys Glu Gln Gln Cys Glu Pro Gly Gly

ES 2 452 929 T3

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

ES 2 452 929 T3

Gln Ser Pro Met Phe Pro Asp Thr Arg Val Ala Gly Thr Gln Thr Thr  
530 535 540

Thr His Leu Pro Gly Ile Pro Pro Asn His Ala Pro Leu Val Thr Thr  
545 550 555 560

Leu Gly Ala Gln Leu Pro Pro Gln Ala Pro Asp Ala Leu Val Leu Arg  
565 570 575

Thr Gln Ala Thr Gln Leu Pro Ile Ile Pro Thr Ala Gln Pro Ser Leu  
580 585 590

Thr Thr Thr Ser Arg Ser Pro Val Ser Pro Ala His Gln Ile Ser Val  
595 600 605

Pro Ala Ala Thr Gln Pro Ala Ala Leu Pro Thr Leu Leu Pro Ser Gln  
610 615 620

Ser Pro Thr Asn Gln Thr Ser Pro Ile Ser Pro Thr His Pro His Ser  
625 630 635 640

Lys Ala Pro Gln Ile Pro Arg Glu Asp Gly Pro Ser Pro Lys Leu Ala  
645 650 655

Leu Trp Leu Pro Ser Pro Ala Pro Thr Ala Ala Pro Thr Ala Leu Gly  
660 665 670

Glu Ala Gly Leu Ala Glu His Ser Gln Arg Asp Asp Arg Trp Leu Leu  
675 680 685

Val Ala Leu Leu Val Pro Thr Cys Val Phe Leu Val Val Leu Leu Ala  
690 695 700

Leu Gly Ile Val Tyr Cys Thr Arg Cys Gly Pro His Ala Pro Asn Lys  
705 710 715 720

Arg Ile Thr Asp Cys Tyr Arg Trp Val Ile His Ala Gly Ser Lys Ser  
725 730 735

Pro Thr Glu Pro Met Pro Pro Arg Gly Ser Leu Thr Gly Val Gln Thr  
740 745 750

Cys Arg Thr Ser Val  
755

<210> 5

<211> 2397

<212> ADN

5 <213> Rattus rattus

<400> 5

ES 2 452 929 T3

atgctgctgc gcctgctgct ggccctgggcg gccgcggtgc ccgcaactggg ccaggccccc 60  
 tggacgccgg agcctagagc cgctgcgcc cccagcagct gctacgctct ctttccccgg 120  
 cgccgcacat tcctggaggc ttggcggtcg tgccgcgaat tggggggcaa cctggccaca 180  
 ccgaggaccc cggaggaggc ccgacgtgtg gacagcctgg tgggcgtcgg acccgccaac 240  
 gggctgctat ggattgggtt gcagcggcag gctcggcaat gccagccaca gcgcccactg 300  
 cggggcttca tatggaccac gggagaccag gacaccgctt tactaactg ggcccagccg 360  
 gctacggaag gaccctgccc ggcccagcgc tgtgctgccc ttgaggccag cggagaacat 420  
 cgctggctcg aaggctcgtg cacactggct gtcgatggct acctctgcca gtttggtttt 480  
 gagggtgcct gtctgcctt gccgcttgag gtgggccaag ccggtccagc tatctacacc 540  
 acacccttca acctggtttc cagtgagttc gaatggctac cttttggctc cgtggcagct 600  
 gtgcagtgcc aagctggcag gggaacgtct ctgttggtgt tgaacaacc ttcaggtggc 660  
 gttggctggt cccagactgg cccactgtgt ccagggactg gctgtggtcc tgacaatggg 720  
 ggttgcgaac atgaatgtgt ggaagagttg gatggcggtg tgtcctgccg ctgcagtgaa 780  
 ggcttccgtc tagcagcaga tgggcacagt tgtgaagacc cttgtgcca ggccccctgt 840  
 gagcagcagt gtgagcctgg tggccacaa ggctacagct gccactgtcg cctaggcttc 900  
 cggccagctg aggatgagcc acaccgctgc gtggacacgg atgagtgcca gattgctggt 960  
 gtgtgccagc agatgtgtgt caactatggt ggtggctttg agtgttactg caggagggtt 1020  
 catgagcttg aggcagatgg tatcagttgt agccctgcag gagctatggg tgcccaggct 1080  
 tcccaggatc ttagagacga gttgctggat gatggagaag aaggggagga tgaagaggag 1140  
 ccctgggagg acttcgatgg cacctggaca gaggagcagg ggaccctatg gatggcacct 1200  
 acacatccgc ctgactttgg cctgccctat aggcccaact tcccacagga tggagagcct 1260  
 cagagattgc acctggagcc tacctggcca cccccactta gcgccccag gggcccctac 1320  
 cactcctcag tgggtgtctgc cacacggccc atggtaactc ctgccactcg acccacacaa 1380  
 cttctgccc gaaagacctc tgttatttca gccacacacc tacccttaa cctgtccac 1440  
 ccactgccc tagcccctac cacacctcca gccgtgctcc ctgagacca gatcccaaa 1500  
 atcaaggcca gttatccaga cttgcctttt ggccacaagc ctgggataac ctcagccact 1560  
 caccagcac agcctcctcc tcaccagccc cccatcatct caacgaaata tcccgaagtc 1620

ES 2 452 929 T3

ttccctcccc agcaggcccc tatgtctcca gacaccaca ctatcactaa tttgcctcta 1680  
atcccatctc accttgacct tggggatacc acttcccaag cgggtcacca tcctttgctc 1740  
ccagatgttc caggtatcag aaccaggct cccagggtt ctgtctcagc tctccagccc 1800  
tctctgccta ccaactccag gtcttctgtc catgaacccc ctgtgcctac tgccaaccag 1860  
ccccagcct tccttctcc cctgccccct cagagccca ttaaccagac ctcatctatc 1920  
agccctacac actcctattc cagagcccct caggteccaa gggaaggagc tcccagtccc 1980  
aatcagtgc caaggctgca ctcagtggcc cccacagcag ctccaacagc cctggcagag 2040  
ttgggtcttg caggccaaag ccagagagat gaccgatggc tgctggtggc actcttgta 2100  
ccaacgtgtg tcttcttggg ggtcctgctc gcattgggca ttgtgtactg cactcgtgt 2160  
ggctcccata cgcccaacaa gcgtatcact gactgctatc gctgggtcac gcatgctggg 2220  
aacaagagct caacagaacc catgcccccc agatggacag agaaggttct gttcctttaa 2280  
cccagcattc atggcaaagg acacactgaa ggactccagg acctcaaggg gtgggtgctg 2340  
ggatcttctc caataaatgg cgtgccaacc tcacccaaag tccgtgatcc ccgctga 2397

<210> 6  
<211> 798  
<212> PRT  
5 <213> Rattus rattus

<400> 6  
Met Leu Leu Arg Leu Leu Ala Trp Ala Ala Ala Val Pro Ala Leu  
1 5 10 15  
Gly Gln Ala Pro Trp Thr Pro Glu Pro Arg Ala Ala Cys Gly Pro Ser  
20 25 30  
Ser Cys Tyr Ala Leu Phe Pro Arg Arg Arg Thr Phe Leu Glu Ala Trp  
35 40 45  
Arg Ser Cys Arg Glu Leu Gly Gly Asn Leu Ala Thr Pro Arg Thr Pro  
50 55 60  
Glu Glu Ala Arg Arg Val Asp Ser Leu Val Gly Val Gly Pro Ala Asn  
65 70 75 80  
Gly Leu Leu Trp Ile Gly Leu Gln Arg Gln Ala Arg Gln Cys Gln Pro  
85 90 95  
Gln Arg Pro Leu Arg Gly Phe Ile Trp Thr Thr Gly Asp Gln Asp Thr  
100 105 110



ES 2 452 929 T3

Ala Phe Thr Asn Trp Ala Gln Pro Ala Thr Glu Gly Pro Cys Pro Ala  
 115 120 125

Gln Arg Cys Ala Ala Leu Glu Ala Ser Gly Glu His Arg Trp Leu Glu  
 130 135 140

Gly Ser Cys Thr Leu Ala Val Asp Gly Tyr Leu Cys Gln Phe Gly Phe  
 145 150 155 160

Glu Gly Ala Cys Pro Ala Leu Pro Leu Glu Val Gly Gln Ala Gly Pro  
 165 170 175

Ala Ile Tyr Thr Thr Pro Phe Asn Leu Val Ser Ser Glu Phe Glu Trp  
 180 185 190

Leu Pro Phe Gly Ser Val Ala Ala Val Gln Cys Gln Ala Gly Arg Gly  
 195 200 205

Thr Ser Leu Leu Cys Val Lys Gln Pro Ser Gly Gly Val Gly Trp Ser  
 210 215 220

Gln Thr Gly Pro Leu Cys Pro Gly Thr Gly Cys Gly Pro Asp Asn Gly  
 225 230 235 240

Gly Cys Glu His Glu Cys Val Glu Glu Leu Asp Gly Gly Met Ser Cys  
 245 250 255

Arg Cys Ser Glu Gly Phe Arg Leu Ala Ala Asp Gly His Ser Cys Glu  
 260 265 270

Asp Pro Cys Ala Gln Ala Pro Cys Glu Gln Gln Cys Glu Pro Gly Gly  
 275 280 285

Pro Gln Gly Tyr Ser Cys His Cys Arg Leu Gly Phe Arg Pro Ala Glu  
 290 295 300

Asp Glu Pro His Arg Cys Val Asp Thr Asp Glu Cys Gln Ile Ala Gly  
 305 310 315 320

Val Cys Gln Gln Met Cys Val Asn Tyr Val Gly Gly Phe Glu Cys Tyr  
 325 330 335

Cys Arg Glu Gly His Glu Leu Glu Ala Asp Gly Ile Ser Cys Ser Pro  
 340 345 350

ES 2 452 929 T3

Ala Gly Ala Met Gly Ala Gln Ala Ser Gln Asp Leu Arg Asp Glu Leu  
 355 360 365

Leu Asp Asp Gly Glu Glu Gly Glu Asp Glu Glu Glu Pro Trp Glu Asp  
 370 375 380

Phe Asp Gly Thr Trp Thr Glu Glu Gln Gly Thr Leu Trp Met Ala Pro  
 385 390 395 400

Thr His Pro Pro Asp Phe Gly Leu Pro Tyr Arg Pro Asn Phe Pro Gln  
 405 410 415

Asp Gly Glu Pro Gln Arg Leu His Leu Glu Pro Thr Trp Pro Pro Pro  
 420 425 430

Leu Ser Ala Pro Arg Gly Pro Tyr His Ser Ser Val Val Ser Ala Thr  
 435 440 445

Arg Pro Met Val Ile Ser Ala Thr Arg Pro Thr Gln Pro Ser Ala Arg  
 450 455 460

Lys Thr Ser Val Ile Ser Ala Thr His Leu Pro Leu Asn Pro Val His  
 465 470 475 480

Pro Pro Ala Leu Ala Pro Thr Thr Pro Pro Ala Val Leu Pro Glu His  
 485 490 495

Gln Ile Pro Lys Ile Lys Ala Ser Tyr Pro Asp Leu Pro Phe Gly His  
 500 505 510

Lys Pro Gly Ile Thr Ser Ala Thr His Pro Ala Gln Pro Pro Pro His  
 515 520 525

Gln Pro Pro Ile Ile Ser Thr Lys Tyr Pro Gln Val Phe Pro Pro Gln  
 530 535 540

Gln Ala Pro Met Ser Pro Asp Thr His Thr Ile Thr Asn Leu Pro Leu  
 545 550 555 560

Ile Pro Ser His Leu Asp Pro Gly Asp Thr Thr Ser Gln Ala Gly His  
 565 570 575

His Pro Leu Leu Pro Asp Val Pro Gly Ile Arg Thr Gln Ala Pro Gln  
 580 585 590

Val Ser Val Ser Ala Leu Gln Pro Ser Leu Pro Thr Asn Ser Arg Ser

ES 2 452 929 T3

595 600 605

Ser Val His Glu Pro Pro Val Pro Thr Ala Asn Gln Pro Pro Ala Phe  
610 615 620

Pro Ser Pro Leu Pro Pro Gln Ser Pro Ile Asn Gln Thr Ser Ser Ile  
625 630 635 640

Ser Pro Thr His Ser Tyr Ser Arg Ala Pro Gln Val Pro Arg Glu Gly  
645 650 655

Ala Pro Ser Pro Lys Ser Val Pro Arg Leu His Ser Val Ala Pro Thr  
660 665 670

Ala Ala Pro Thr Ala Leu Ala Glu Leu Gly Leu Ala Gly Gln Ser Gln  
675 680 685

Arg Asp Asp Arg Trp Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Pro Thr Cys Val  
690 695 700

Phe Leu Val Val Leu Leu Ala Leu Gly Ile Val Tyr Cys Thr Arg Cys  
705 710 715 720

Gly Ser His Thr Pro Asn Lys Arg Ile Thr Asp Cys Tyr Arg Trp Val  
725 730 735

Thr His Ala Gly Asn Lys Ser Ser Thr Glu Pro Met Pro Pro Arg Trp  
740 745 750

Thr Glu Lys Val Leu Phe Leu Glu Pro Ser Ile His Gly Lys Gly His  
755 760 765

Thr Glu Gly Leu Gln Asp Leu Lys Gly Trp Val Leu Gly Ser Ser Pro  
770 775 780

Ile Asn Gly Val Pro Thr Ser Pro Lys Val Arg Asp Pro Arg  
785 790 795

<210> 7

<211> 705

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de Ácido Nucleico que codifica la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1 con la secuencia líder

<400> 7

ES 2 452 929 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgac 60  
atccagatga cccagagccc aagcagcctg agcgccagcg tgggtgacag agtgaccatc 120  
acctgtagag ccagccagaa tgtgggtact gctgtagcct ggctacagca gaccccaggt 180  
aaggctccaa agctgctgat ctactcggca tcgaatcggg aactggtgt gccaaagcaga 240  
ttcagcggta gcggtagcgg taccgactac accttcacca tcagcagcct ccagccagag 300  
gacatcgcca cctactactg ccagcaatat accaactatc ccatgtacac gttcggccaa 360  
gggaccaagg tgcaaatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420  
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480  
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540  
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600  
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660  
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa 705

<210> 8  
<211> 1422  
<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo M4 con la secuencia líder

<400> 8

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60  
gtccaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgagaccta gccagaccct gagcctgacc 120  
tgcaccgcgt ctggctacac cttcaactgac tatgttatac actgggtgaa acagccacct 180  
ggacgaggtc ttgagtggat tggatatatt aatccttatg atgatgatac tacctacaac 240  
cagaagtca agggcagagt gacaatgctg gtagacacca gctccaacac agcctacctg 300  
agaçtcagca gcgtgacagc cgaggacacc gcggtctatt attgtgcaag aagggggaat 360  
tcctatgatg gttactttga ctactctatg gactactggg gatccgggac cccggtcacc 420  
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 480  
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540  
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 600  
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 660  
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720  
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc 780

ES 2 452 929 T3

ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 840  
 cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 900  
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960  
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1020  
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc acaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080  
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1140  
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1200  
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc 1260  
 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320  
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1380  
 cactacagc agaagagcct ctcctgtct cccgggaat ga 1422

<210> 9

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1 con la secuencia líder

<400> 9

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

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val  
 35 40 45

Gly Thr Ala Val Ala Trp Leu Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg  
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Asn  
 100 105 110

ES 2 452 929 T3

Tyr Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 10

<211> 648

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido que codifica la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1 sin la secuencia líder

<400> 10

gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

atcacctgta gagccagcca gaatgtgggt actgctgtag cctggctaca gcagacccca 120

ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcgaatc ggtacactgg tgtgccaagc 180

agattcagcg gtagcggtag cggtagccgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca 240

gaggacatcg ccacctaacta ctgccagcaa tataccaact atcccatgta cacgttcggc 300

caagggacca aggtgcaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

10 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttaa 648

<210> 11

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

ES 2 452 929 T3

<223> Secuencia de aminoácido de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1 sin la secuencia líder

<400> 11

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Asn Tyr Pro Met  
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Arg Thr Val Ala  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

- 5 <210> 12
- <211> 33
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la CDR1 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 12  
agagccagcc agaatgtggg tactgctgta gcc

33

ES 2 452 929 T3

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

5 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácido de CDR1 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 13  
 Arg Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala  
 1                    5                                    10

10 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido que codifica la CDR2 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

15 <400> 14  
 tcggcatcga atcggtacac t                                    21

<210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 15  
 Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
 1                    5

25 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido que codifica la CDR3 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

30 <400> 16  
 cagcaatata ccaactatcc catgtacacg                                    30

<210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácido de CDR3 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 17  
 Gln Gln Tyr Thr Asn Tyr Pro Met Tyr Thr  
 1                    5                                    10

40 <210> 18  
 <211> 294  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido que codifica el dominio variable de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 18



ES 2 452 929 T3

gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60  
 atcacctgta gagccagcca gaatgtgggt actgctgtag cctggctaca gcagaccca 120  
 ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcgaatc ggtacactgg tgtgccaagc 180  
 agattcagcg gttagcgtag cggtagccgac tacaccttca ccatcagcag cotccagcca 240  
 gaggacatcg ccactacta ctgccagcaa tataccaact atcccatgta cacg 294

<210> 19  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 19  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Asn Tyr Pro Met  
 85 90 95

Tyr Thr

10 <210> 20  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 15 <223> Secuencia de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo M4 más la secuencia líder

<400> 20

ES 2 452 929 T3

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg  
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Asp Tyr Val Ile His Trp Val Lys Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asp Asp Asp Thr Thr Tyr Asn

ES 2 452 929 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 75  |  |  |  |  | 80  |
| Gln | Lys | Phe | Lys | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Leu | Val | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn |  |  |  |  |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |  |  |     |
| Thr | Ala | Tyr | Leu | Arg | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |  |  |  |  |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |  |  |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Arg | Gly | Asn | Ser | Tyr | Asp | Gly | Tyr | Phe | Asp | Tyr |  |  |  |  |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |  |     |
| Ser | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Ser | Gly | Thr | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala |  |  |  |  |     |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |  |  |     |
| Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser |  |  |  |  |     |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     |  |  |  |  | 160 |
| Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe |  |  |  |  |     |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |  |  |  |  |     |
| Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly |  |  |  |  |     |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |  |  |     |
| Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu |  |  |  |  |     |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |  |     |
| Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr |  |  |  |  |     |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |  |     |
| Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys |  |  |  |  |     |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |     |
| Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro |  |  |  |  |     |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |     |  |  |  |  |     |
| Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys |  |  |  |  |     |
|     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |  |     |
| Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val |  |  |  |  |     |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |  |     |
| Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr |  |  |  |  |     |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |  |     |
| Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu |  |  |  |  |     |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |  |     |

ES 2 452 929 T3

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

- <210> 21
- <211> 1365
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

5

- <220>
- <223> Secuencia de nucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo M4 sin la secuencia líder

<400> 21  
 caggtccaac tgcaggagag cgggccaggt cttgtgagac ctgccagac cctgagcctg 60  
 acctgcaccg cgtctggcta caccttact gactatgta tacactgggt gaaacagcca 120  
 cctggacgag gtcttgagt gattggatat attaactctt atgatgatga tactacctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcag agtgacaatg ctggtagaca ccagctcaa cacagcctac 240  
 ctgagactca gcagcgtgac agccgaggac accgcggtct attattgtgc aagaagggg 300

ES 2 452 929 T3

aattcctatg atggttactt tgactactct atggactact ggggatccgg gaccccggtc 360  
accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag 420  
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggcca aggactactt ccccgaaccg 480  
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540  
ctacagtctt caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600  
ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660  
aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 720  
ctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 780  
tcccggacc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 840  
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900  
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960  
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1020  
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080  
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtaa aggttctat 1140  
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200  
agcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1260  
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320  
aaccactaca cgagaagag cctctccctg tctcccggga aatga 1365

<210> 22

<211> 454

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo M4 sin la secuencia líder

<400> 22

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

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

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

ES 2 452 929 T3

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Asn Ser Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr Ser Met Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Ser Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
180 185 190

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

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

ES 2 452 929 T3

290

295

300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 23

<211> 1422

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo M4.1 con la secuencia líder

<400> 23

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt cactcccag 60

gtccaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgagaccta gccagaccct gagcctgacc 120

tgcaccgcgt ctggtacac cttcactgac tatgttatac actgggtgaa acagccacct 180

ggacgaggtc ttgagtggat tggatatatt aatccttatg atgatgatac tacctacaac 240

ES 2 452 929 T3

cagaagttca agggcagagt gacaatgctg gtagacacca gctccaacac agcctacctg 300  
 agactcagca gcgtgacagc cgaggacacc gcggtctatt attgtgcaag aagggggaat 360  
 tcctatgatg gttactttga ctactctatg gactactggg gatccgggac cccggtcacc 420  
 gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 480  
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 540  
 acgggtgctg ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 600  
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 660  
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720  
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 780  
 ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc caaaaacca aggacaccct catgatctcc 840  
 cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggtaag 900  
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960  
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtccctaccg tcctgcacca ggactggctg 1020  
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080  
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1140  
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc 1200  
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1260  
 cctcccgtgc tggactccga cggcttcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320  
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1380  
 cactacagc agaagagcct ctccctgtct cccgggaaat ga 1422

<210> 24

<211> 473

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo M4.1 con la secuencia líder

<400> 24

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg  
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe



ES 2 452 929 T3

|            |     |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |  |  |  |  |  |  |
|------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|--|--|--|--|--|
| 35         | 40  | 45         |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |  |  |  |  |  |  |
| Thr<br>50  | Asp | Tyr        | Val        | Ile        | His        | Trp        | Val        | Lys        | Gln        | Pro        | Pro<br>60  | Gly        | Arg        | Gly        | Leu        |  |  |  |  |  |  |
| Glu<br>65  | Trp | Ile        | Gly        | Tyr        | Ile<br>70  | Asn        | Pro        | Tyr        | Asp        | Asp<br>75  | Asp        | Thr        | Thr        | Tyr        | Asn<br>80  |  |  |  |  |  |  |
| Gln        | Lys | Phe        | Lys        | Gly        | Arg<br>85  | Val        | Thr        | Met        | Leu<br>90  | Val        | Asp        | Thr        | Ser        | Ser<br>95  | Asn        |  |  |  |  |  |  |
| Thr        | Ala | Tyr        | Leu<br>100 | Arg        | Leu        | Ser        | Ser        | Val<br>105 | Thr        | Ala        | Glu        | Asp        | Thr        | Ala<br>110 | Val        |  |  |  |  |  |  |
| Tyr        | Tyr | Cys<br>115 | Ala        | Arg        | Arg        | Gly        | Asn<br>120 | Ser        | Tyr        | Asp        | Gly        | Tyr<br>125 | Phe        | Asp        | Tyr        |  |  |  |  |  |  |
| Ser<br>130 | Met | Asp        | Tyr        | Trp        | Gly        | Ser<br>135 | Gly        | Thr        | Pro        | Val        | Thr<br>140 | Val        | Ser        | Ser        | Ala        |  |  |  |  |  |  |
| Ser<br>145 | Thr | Lys        | Gly        | Pro        | Ser<br>150 | Val        | Phe        | Pro        | Leu        | Ala<br>155 | Pro        | Ser        | Ser        | Lys        | Ser<br>160 |  |  |  |  |  |  |
| Thr        | Ser | Gly        | Gly        | Thr<br>165 | Ala        | Ala        | Leu        | Gly        | Cys<br>170 | Leu        | Val        | Lys        | Asp        | Tyr<br>175 | Phe        |  |  |  |  |  |  |
| Pro        | Glu | Pro        | Val<br>180 | Thr        | Val        | Ser        | Trp        | Asn<br>185 | Ser        | Gly        | Ala        | Leu        | Thr<br>190 | Ser        | Gly        |  |  |  |  |  |  |
| Val        | His | Thr<br>195 | Phe        | Pro        | Ala        | Val        | Leu<br>200 | Gln        | Ser        | Ser        | Gly        | Leu<br>205 | Tyr        | Ser        | Leu        |  |  |  |  |  |  |
| Ser<br>210 | Ser | Val        | Val        | Thr        | Val        | Pro<br>215 | Ser        | Ser        | Ser        | Leu        | Gly<br>220 | Thr        | Gln        | Thr        | Tyr        |  |  |  |  |  |  |
| Ile<br>225 | Cys | Asn        | Val        | Asn        | His<br>230 | Lys        | Pro        | Ser        | Asn        | Thr<br>235 | Lys        | Val        | Asp        | Lys        | Lys<br>240 |  |  |  |  |  |  |
| Val        | Glu | Pro        | Lys        | Ser        | Cys<br>245 | Asp        | Lys        | Thr        | His<br>250 | Thr        | Cys        | Pro        | Pro        | Cys<br>255 | Pro        |  |  |  |  |  |  |
| Ala        | Pro | Glu        | Leu<br>260 | Leu        | Gly        | Gly        | Pro<br>265 | Ser        | Val        | Phe        | Leu        | Phe        | Pro<br>270 | Pro        | Lys        |  |  |  |  |  |  |
| Pro        | Lys | Asp<br>275 | Thr        | Leu        | Met        | Ile        | Ser<br>280 | Arg        | Thr        | Pro        | Glu        | Val<br>285 | Thr        | Cys        | Val        |  |  |  |  |  |  |

ES 2 452 929 T3

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Phe Phe Phe Leu  
 420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 25

<211> 1365

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo M4.1 sin la secuencia líder

<400> 25

caggtccaac tgcaggagag cgggtccaggt cttgtgagac ctagccagac cctgagcctg 60

ES 2 452 929 T3

```

acctgcaccg cgtctggcta caccttcaact gactatgtta tacactgggt gaaacagcca 120
cctggacgag gtcttgagtg gattggatat attaatcctt atgatgatga tactacctac 180
aaccagaagt tcaagggcag agtgacaatg ctggtagaca ccagctcaa cacagcctac 240
ctgagactca gcagcgtgac agccgaggac accgcggtct attattgtgc aagaaggggg 300
aatcctatg atggttactt tgactactct atggactact ggggatccgg gaccccggtc 360
accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccttgggc tgacctgtca aggactactt cccogaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtctt caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 720
ctctggggg gaccgtcagt ctctctctc cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc 780
tcccgacc ctaggtcac atgcgtgggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1020
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080
tcccggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtaaa aggttctat 1140
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200
agcctcccg tgetggactc cgacggcttc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1260
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctcccggga aatga 1365

```

<210> 26

<211> 454

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo M4.1 sin la secuencia líder

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1

5

10

15

ES 2 452 929 T3

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Asn Ser Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr Ser Met Asp  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Ser Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

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

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

ES 2 452 929 T3

260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Phe Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 27  
 <211> 30  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido que codifica la CDR1 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 27  
 ggctacacct tcaactgacta tgttatacac 30

10 <210> 28  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 452 929 T3

<223> Secuencia de aminoácido de CDR1 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 28  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile His  
 1                    5                            10

5 <210> 29  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido que codifica la CDR2 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

10 <400> 29  
 tatattaatc cttatgatga tgatactacc tacaaccaga agttcaaggg c        51

<210> 30  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácido de CDR2 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 30  
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asp Asp Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1                    5                            10                            15

20 Gly

<210> 31  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido que codifica CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 31  
 gcaagaaggg ggaattccta tgatggttac tttgactact ctatggacta c        51

30 <210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

35 <400> 32  
 Ala Arg Arg Gly Asn Ser Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr Ser Met Asp  
 1                    5                            10                            15

Tyr

<210> 33  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido que codifica el dominio variable de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 33

ES 2 452 929 T3

caggccaac tgcaggagag cggccaggt cttgtgagac ctagccagac cctgagcctg 60  
 acctgcaccg cgtctggcta caccttcaact gactatgta tacactgggt gaaacagcca 120  
 cctggacgag gtcttgagtg gattggatat attaatcctt atgatgatga tactacctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcag agtgacaatg ctggtagaca ccagctccaa cacagcctac 240  
 ctgagactca gcagcgtgac agccgaggac accgcggtct attattgtgc aagaaggggg 300  
 aattcctatg atggttactt tgactactct atggactac 339

<210> 34  
 <211> 113  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácido del dominio variable de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 34

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Val Ile His Trp Val Lys Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Asn Ser Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr Ser Met Asp  
 100 105 110

10 Tyr

<210> 35  
 <211> 2477  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 35

ES 2 452 929 T3

Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Leu Ala Val Gln Cys  
 1 5 10 15

Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Thr Gly Ala Ser Lys Ser Lys Arg Gln  
 20 25 30

Ala Gln Gln Met Val Gln Pro Gln Ser Pro Val Ala Val Ser Gln Ser  
 35 40 45

Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln  
 50 55 60

Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Asn Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr Gly  
 65 70 75 80

Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Ala Glu Glu Thr  
 85 90 95

Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr Tyr  
 100 105 110

Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly Ala



ES 2 452 929 T3

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

ES 2 452 929 T3

Arg Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp Gly His Leu  
 370 375 380

Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser Phe  
 385 390 395 400

Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser Asn  
 405 410 415

Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr Thr  
 420 425 430

Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly Thr  
 435 440 445

Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met Ala  
 450 455 460

Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg Ile  
 465 470 475 480

Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg Cys  
 485 490 495

Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr Ser  
 500 505 510

Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val Asn  
 515 520 525

Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys Thr  
 530 535 540

Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp Gln  
 545 550 555 560

Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp  
 565 570 575

Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly Arg  
 580 585 590

Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser Ser  
 595 600 605

ES 2 452 929 T3

Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro Asn  
610 615 620

Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser Lys  
625 630 635 640

Tyr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Lys Asn Ser Val Gly Arg Trp Lys Glu  
645 650 655

Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu Lys  
660 665 670

Pro Gly Val Val Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Ile Gln Gln Tyr Gly  
675 680 685

His Gln Glu Val Thr Arg Phe Asp Phe Thr Thr Thr Ser Thr Ser Thr  
690 695 700

Pro Val Thr Ser Asn Thr Val Thr Gly Glu Thr Thr Pro Phe Ser Pro  
705 710 715 720

Leu Val Ala Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser Phe  
725 730 735

Val Val Ser Trp Val Ser Ala Ser Asp Thr Val Ser Gly Phe Arg Val  
740 745 750

Glu Tyr Glu Leu Ser Glu Glu Gly Asp Glu Pro Gln Tyr Leu Asp Leu  
755 760 765

Pro Ser Thr Ala Thr Ser Val Asn Ile Pro Asp Leu Leu Pro Gly Arg  
770 775 780

Lys Tyr Ile Val Asn Val Tyr Gln Ile Ser Glu Asp Gly Glu Gln Ser  
785 790 795 800

Leu Ile Leu Ser Thr Ser Gln Thr Thr Ala Pro Asp Ala Pro Pro Asp  
805 810 815

Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg Trp Ser  
820 825 830

Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Val Tyr Ser Pro Ser  
835 840 845

ES 2 452 929 T3

Val Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Asn Leu Pro Glu Thr Ala Asn Ser  
850 855 860

Val Thr Leu Ser Asp Leu Gln Pro Gly Val Gln Tyr Asn Ile Thr Ile  
865 870 875 880

Tyr Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Thr Pro Val Val Ile Gln Gln  
885 890 895

Glu Thr Thr Gly Thr Pro Arg Ser Asp Thr Val Pro Ser Pro Arg Asp  
900 905 910

Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys Val Thr Ile Met Trp Thr  
915 920 925

Pro Pro Glu Ser Ala Val Thr Gly Tyr Arg Val Asp Val Ile Pro Val  
930 935 940

Asn Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg Leu Pro Ile Ser Arg Asn Thr  
945 950 955 960

Phe Ala Glu Val Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr Tyr Phe Lys  
965 970 975

Val Phe Ala Val Ser His Gly Arg Glu Ser Lys Pro Leu Thr Ala Gln  
980 985 990

Gln Thr Thr Lys Leu Asp Ala Pro Thr Asn Leu Gln Phe Val Asn Glu  
995 1000 1005

Thr Asp Ser Thr Val Leu Val Arg Trp Thr Pro Pro Arg Ala Gln  
1010 1015 1020

Ile Thr Gly Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg Arg Gly Gln  
1025 1030 1035

Pro Arg Gln Tyr Asn Val Gly Pro Ser Val Ser Lys Tyr Pro Leu  
1040 1045 1050

Arg Asn Leu Gln Pro Ala Ser Glu Tyr Thr Val Ser Leu Val Ala  
1055 1060 1065

Ile Lys Gly Asn Gln Glu Ser Pro Lys Ala Thr Gly Val Phe Thr  
1070 1075 1080

Thr Leu Gln Pro Gly Ser Ser Ile Pro Pro Tyr Asn Thr Glu Val

ES 2 452 929 T3

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

ES 2 452 929 T3

Thr Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val  
 1325 1330 1335

Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr  
 1340 1345 1350

Gln Gln Thr Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn  
 1355 1360 1365

Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser  
 1370 1375 1380

Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn  
 1385 1390 1395

Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala  
 1400 1405 1410

Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser  
 1415 1420 1425

Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly  
 1430 1435 1440

Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser  
 1445 1450 1455

Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg  
 1460 1465 1470

Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe  
 1475 1480 1485

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser  
 1490 1495 1500

Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser  
 1505 1510 1515

Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly  
 1520 1525 1530

Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val  
 1535 1540 1545

ES 2 452 929 T3

Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala  
1550 1555 1560

Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly  
1565 1570 1575

Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr  
1580 1585 1590

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr  
1595 1600 1605

Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys  
1610 1615 1620

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln  
1625 1630 1635

Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys Trp  
1640 1645 1650

Leu Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr  
1655 1660 1665

Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro  
1670 1675 1680

Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu  
1685 1690 1695

Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln  
1700 1705 1710

Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly  
1715 1720 1725

Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp  
1730 1735 1740

Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser  
1745 1750 1755

Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly  
1760 1765 1770

ES 2 452 929 T3

Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro Gly Ser Glu  
 1775 1780 1785

Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu Ser Gln  
 1790 1795 1800

Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp  
 1805 1810 1815

Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp  
 1820 1825 1830

Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr  
 1835 1840 1845

Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro  
 1850 1855 1860

Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys  
 1865 1870 1875

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg  
 1880 1885 1890

Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro  
 1895 1900 1905

Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile  
 1910 1915 1920

Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp  
 1925 1930 1935

Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys  
 1940 1945 1950

Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr  
 1955 1960 1965

Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser  
 1970 1975 1980

Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser  
 1985 1990 1995

Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser



ES 2 452 929 T3

|                                                                               |  |      |  |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|--|------|--|------|
| 2000                                                                          |  | 2005 |  | 2010 |
| Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr<br>2015 2020 2025 |  |      |  |      |
| Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg<br>2030 2035 2040 |  |      |  |      |
| Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr<br>2045 2050 2055 |  |      |  |      |
| Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser<br>2060 2065 2070 |  |      |  |      |
| Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu<br>2075 2080 2085 |  |      |  |      |
| Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp<br>2090 2095 2100 |  |      |  |      |
| Val Pro Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Val Thr His Pro Gly<br>2105 2110 2115 |  |      |  |      |
| Tyr Asp Thr Gly Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gln<br>2120 2125 2130 |  |      |  |      |
| Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His Gly Phe<br>2135 2140 2145 |  |      |  |      |
| Arg Arg Thr Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Pro Ile Arg His Arg<br>2150 2155 2160 |  |      |  |      |
| Pro Arg Pro Tyr Pro Pro Asn Val Gly Glu Glu Ile Gln Ile Gly<br>2165 2170 2175 |  |      |  |      |
| His Ile Pro Arg Glu Asp Val Asp Tyr His Leu Tyr Pro His Gly<br>2180 2185 2190 |  |      |  |      |
| Pro Gly Leu Asn Pro Asn Ala Ser Thr Gly Gln Glu Ala Leu Ser<br>2195 2200 2205 |  |      |  |      |
| Gln Thr Thr Ile Ser Trp Ala Pro Phe Gln Asp Thr Ser Glu Tyr<br>2210 2215 2220 |  |      |  |      |
| Ile Ile Ser Cys His Pro Val Gly Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gln<br>2225 2230 2235 |  |      |  |      |

ES 2 452 929 T3

Phe Arg Val Pro Gly Thr Ser Thr Ser Ala Thr Leu Thr Gly Leu  
 2240 2245 2250

Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Leu Lys Asp  
 2255 2260 2265

Gln Gln Arg His Lys Val Arg Glu Glu Val Val Thr Val Gly Asn  
 2270 2275 2280

Ser Val Asn Glu Gly Leu Asn Gln Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe  
 2285 2290 2295

Asp Pro Tyr Thr Val Ser His Tyr Ala Val Gly Asp Glu Trp Glu  
 2300 2305 2310

Arg Met Ser Glu Ser Gly Phe Lys Leu Leu Cys Gln Cys Leu Gly  
 2315 2320 2325

Phe Gly Ser Gly His Phe Arg Cys Asp Ser Ser Arg Trp Cys His  
 2330 2335 2340

Asp Asn Gly Val Asn Tyr Lys Ile Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln  
 2345 2350 2355

Gly Glu Asn Gly Gln Met Met Ser Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly  
 2360 2365 2370

Lys Gly Glu Phe Lys Cys Asp Pro His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp  
 2375 2380 2385

Asp Gly Lys Thr Tyr His Val Gly Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr  
 2390 2395 2400

Leu Gly Ala Ile Cys Ser Cys Thr Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly  
 2405 2410 2415

Trp Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg Pro Gly Gly Glu Pro Ser Pro  
 2420 2425 2430

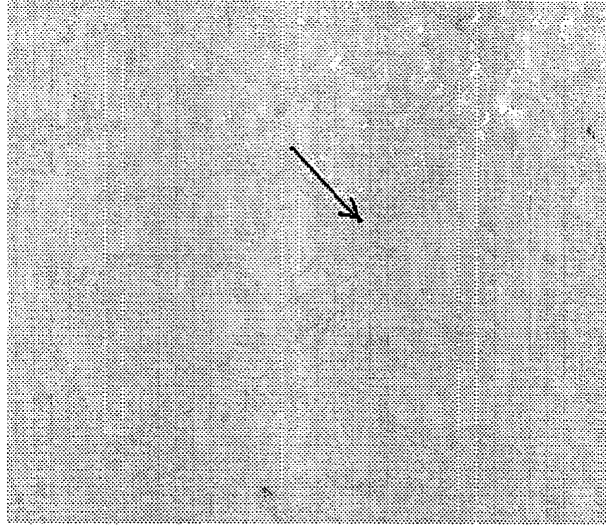
Glu Gly Thr Thr Gly Gln Ser Tyr Asn Gln Tyr Ser Gln Arg Tyr  
 2435 2440 2445

His Gln Arg Thr Asn Thr Asn Val Asn Cys Pro Ile Glu Cys Phe  
 2450 2455 2460

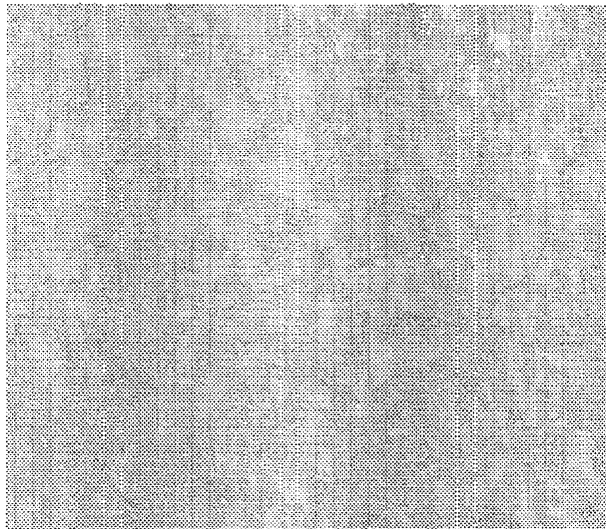
Met Pro Leu Asp Val Gln Ala Asp Arg Glu Asp Ser Arg Glu  
 2465 2470 2475

**REIVINDICACIONES**

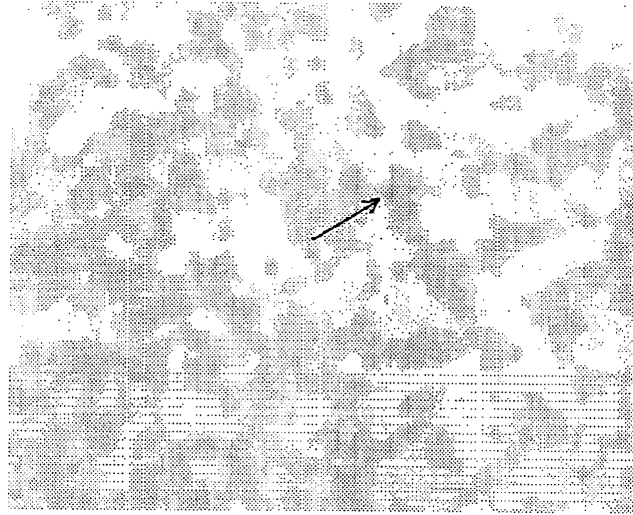
1. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a endosialina y que inhibe la interacción de la endosialina expresada en la superficie de una célula con el colágeno o la fibronectina, para el uso en la inhibición de la neovascularización o la angiogénesis en una neoplasia en un sujeto.
- 5 2. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno no se une a la endosialina murina.
3. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el valor de la afinidad de unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para endosialina es menor de  $1 \times 10^{-7}$  M.
- 10 4. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo quimérico o fragmento de unión al antígeno, o es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno.
- 15 5. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena pesada que comprende la CDR1 de SEQ ID N°:28, CDR2 de SEQ NO:30 y CDR3 de SEQ ID N°:32, y una cadena ligera que comprende la CDR1 de SEQ ID N°:13, CDR2 de SEQ ID N°:15 y CDR3 de SEQ ID N°:17.
- 20 6. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 34 y una cadena ligera que comprende un dominio variable de SEQ ID N°: 19.
- 25 7. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:22 ó 26 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 11.
8. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo es producido por células que tienen el n° de acceso de la ATCC PTA-7554 o el n° de acceso de la ATCC PTA-9017.
9. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha célula es una célula de mamífero.
- 30 10. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha célula es una célula neoplásica.



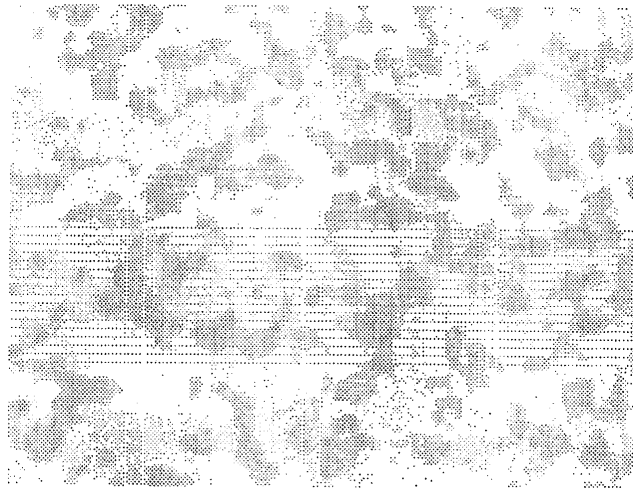
*FIG. 1A*



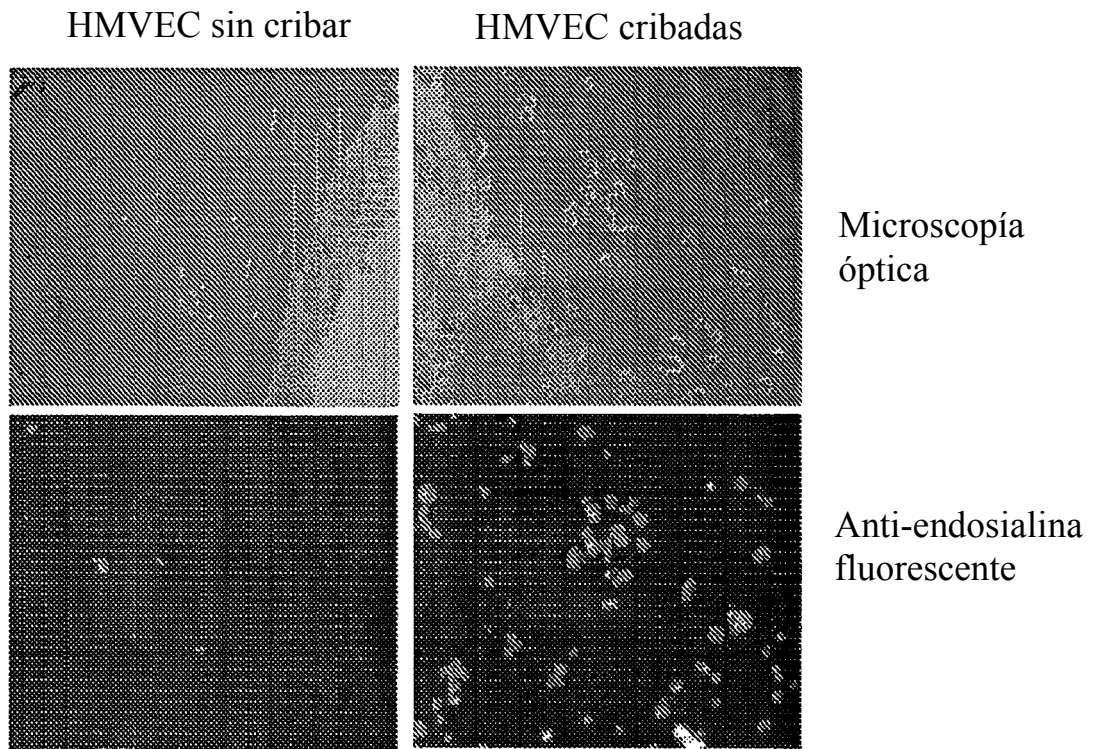
*FIG. 1B*



*FIG. 2A*



*FIG. 2B*



*FIG. 3*

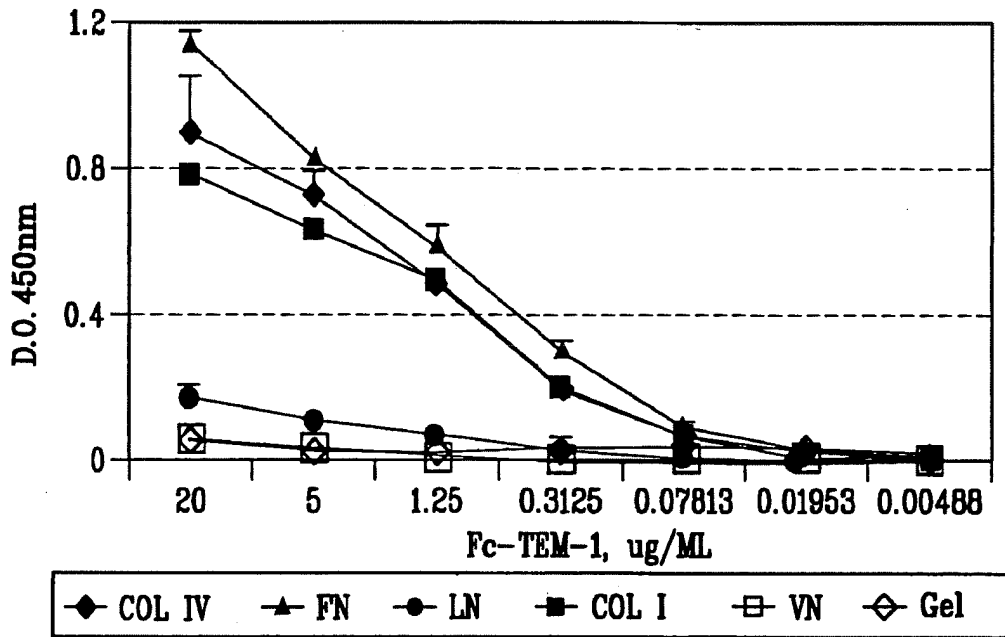


FIG. 4A

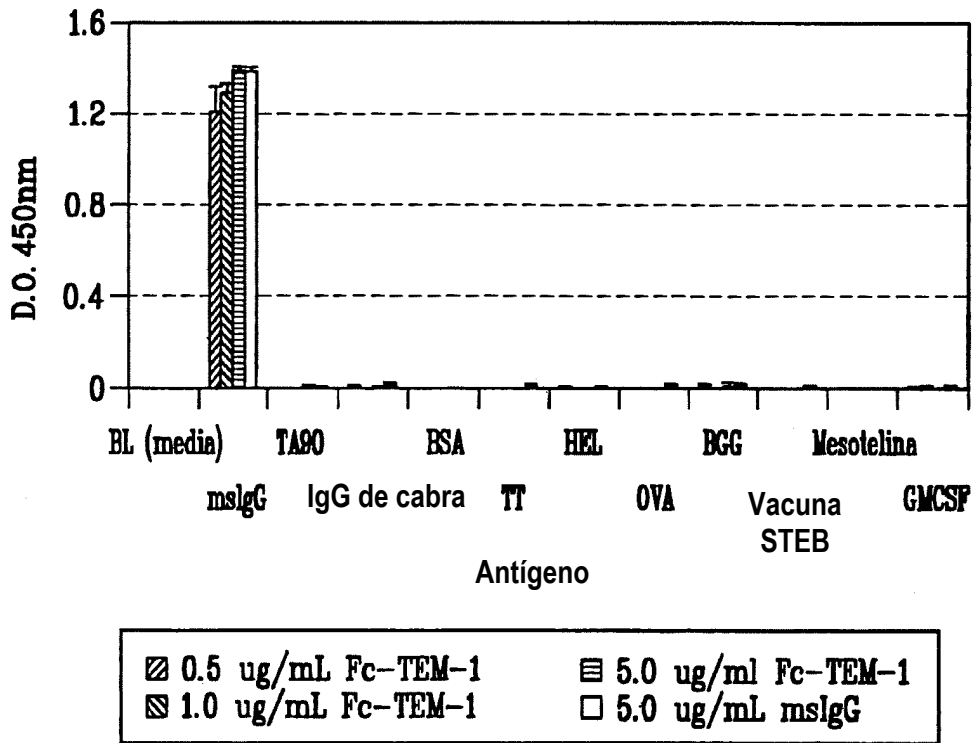
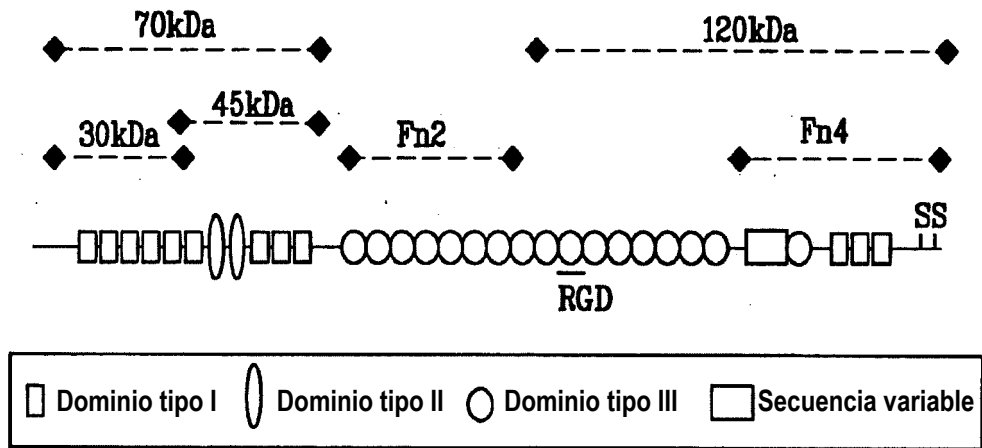
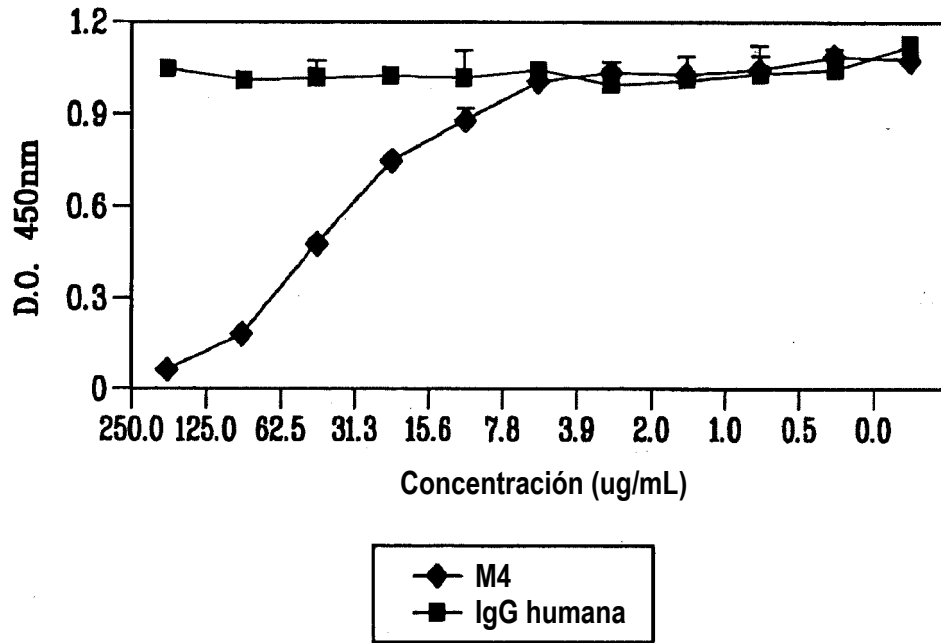


FIG. 4B



*FIG. 5*





*FIG. 6*

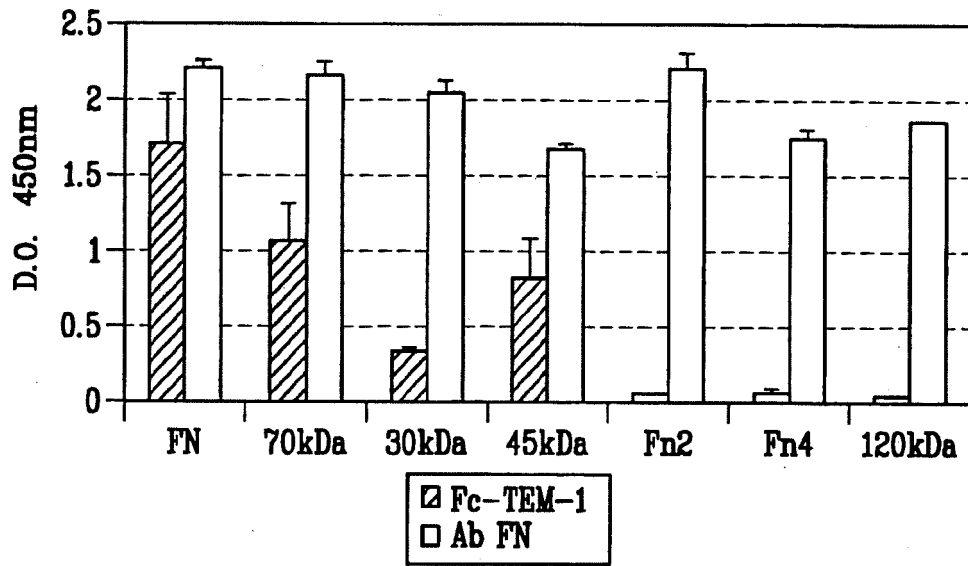


FIG. 7A

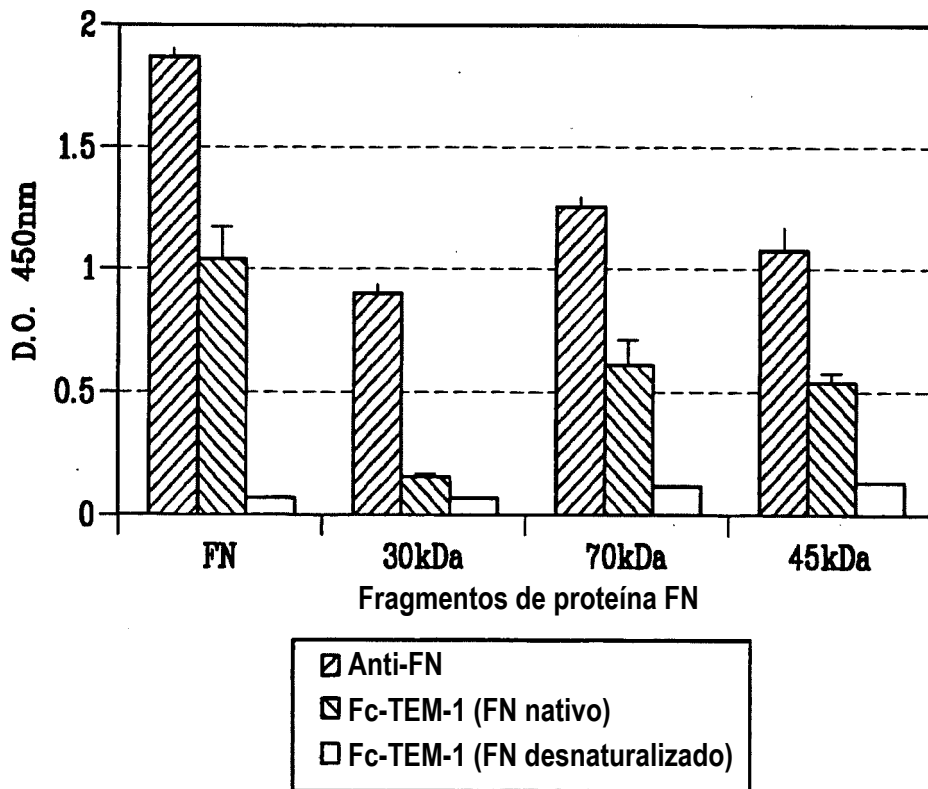


FIG. 7B

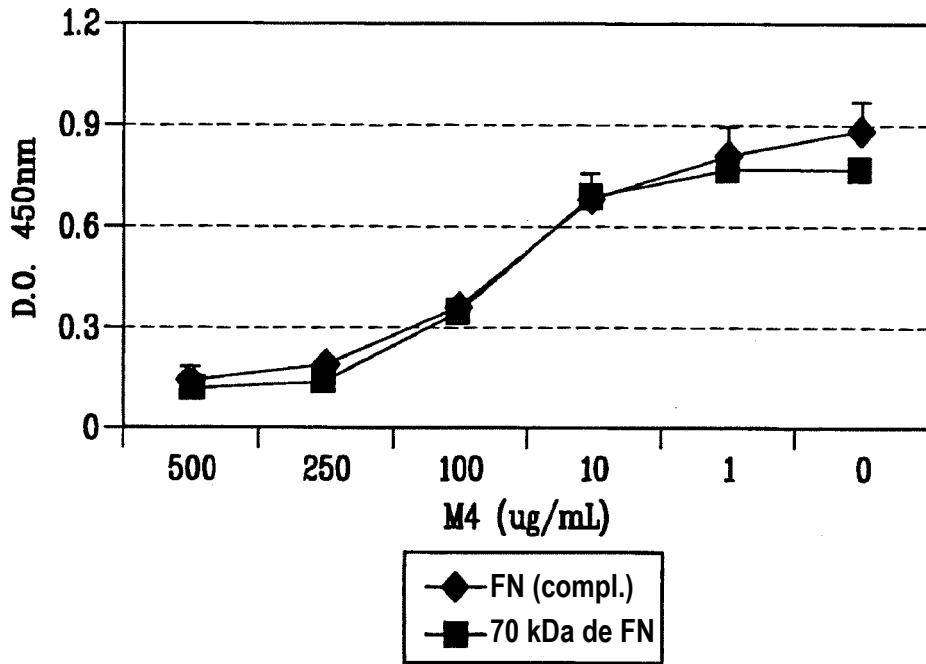


FIG. 7C

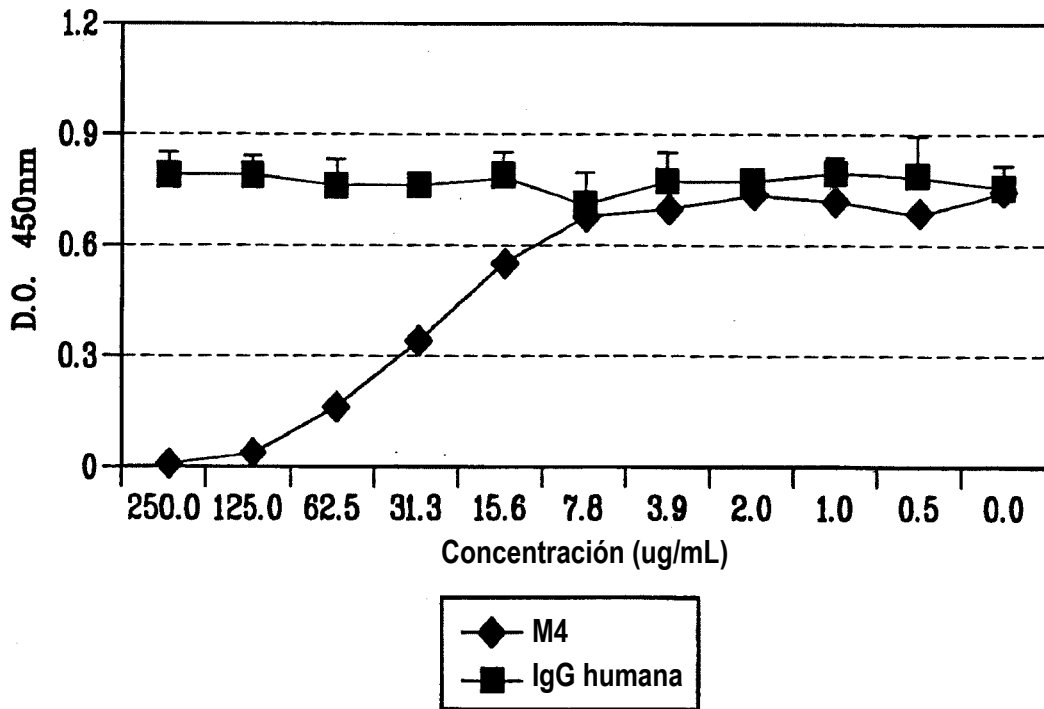
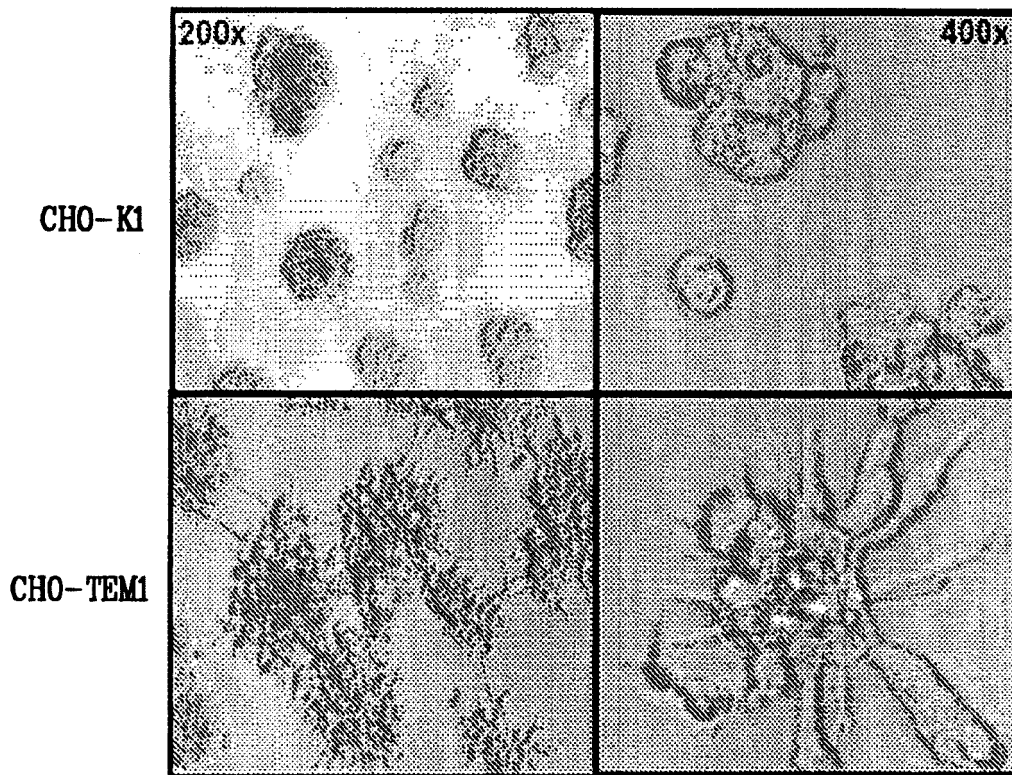
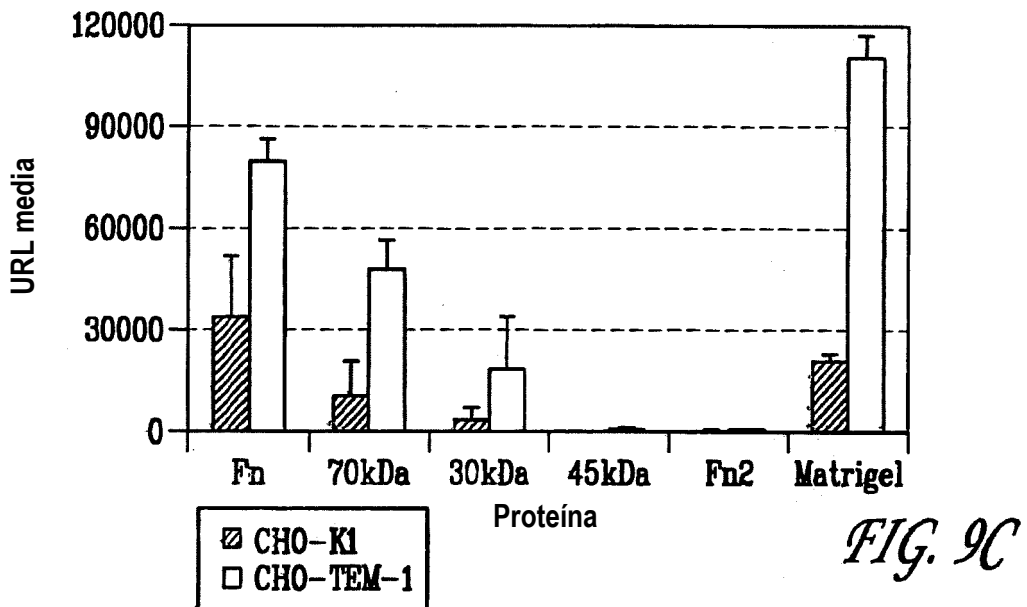
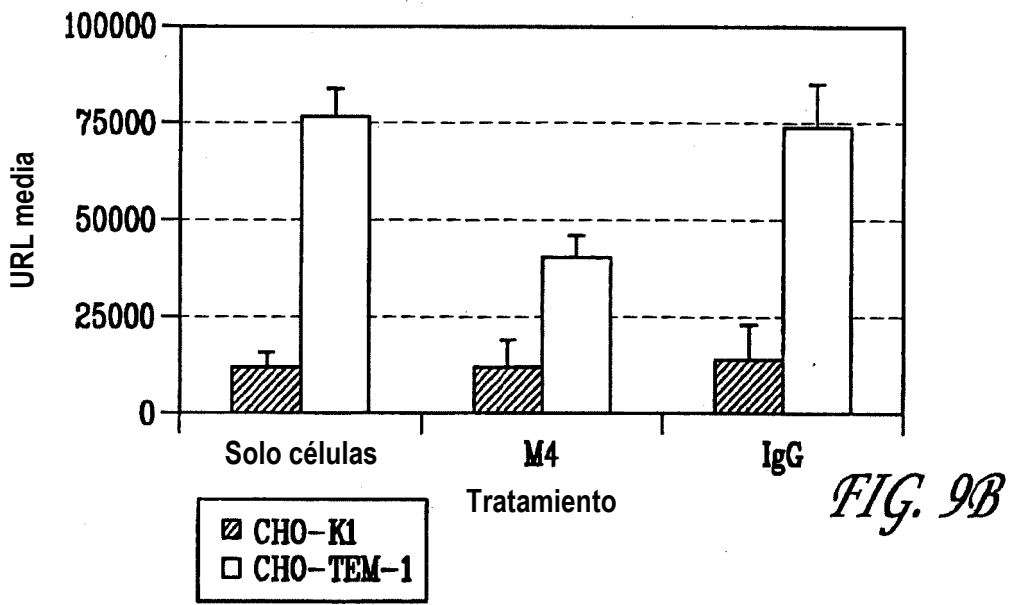
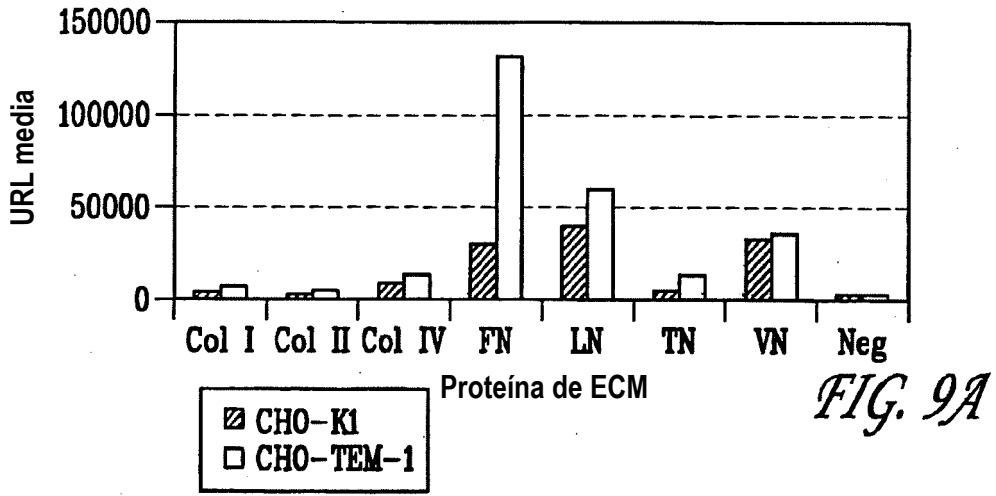
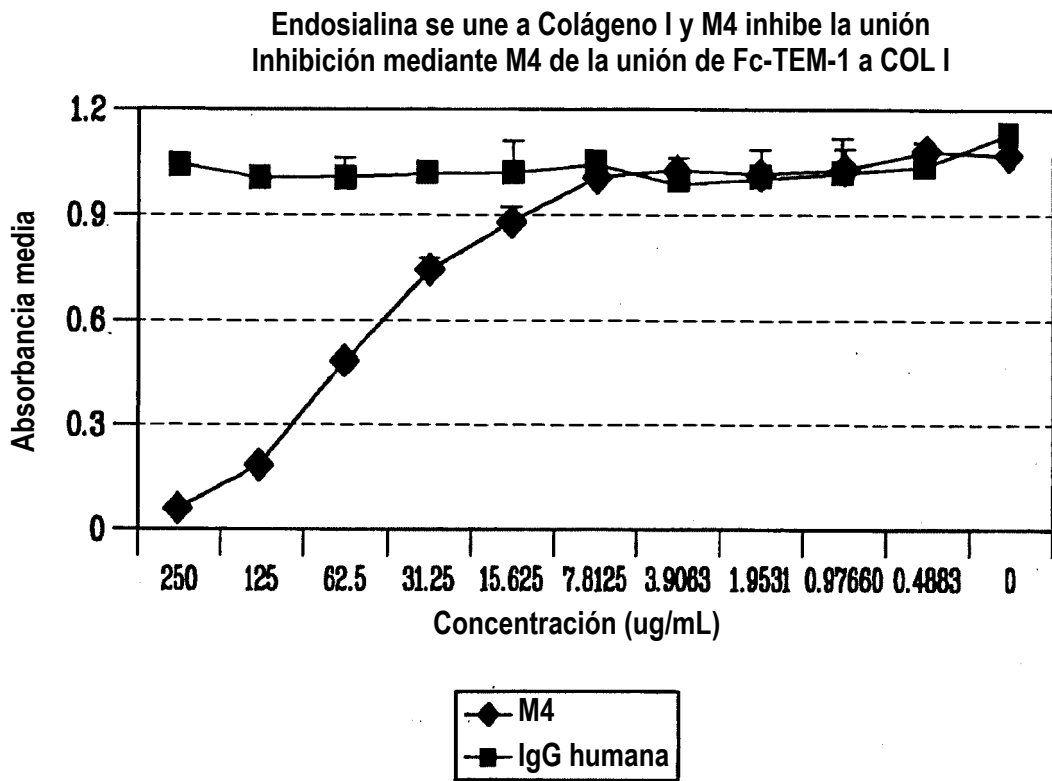


FIG. 7D



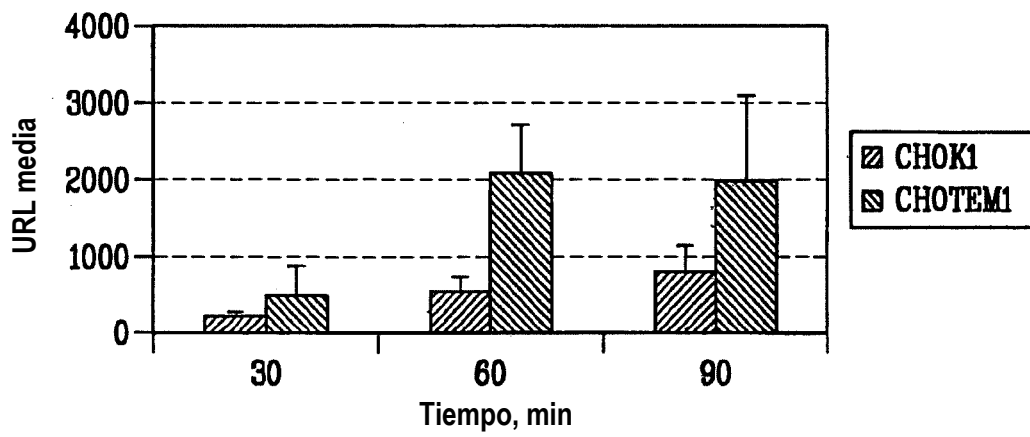
*FIG. 8*



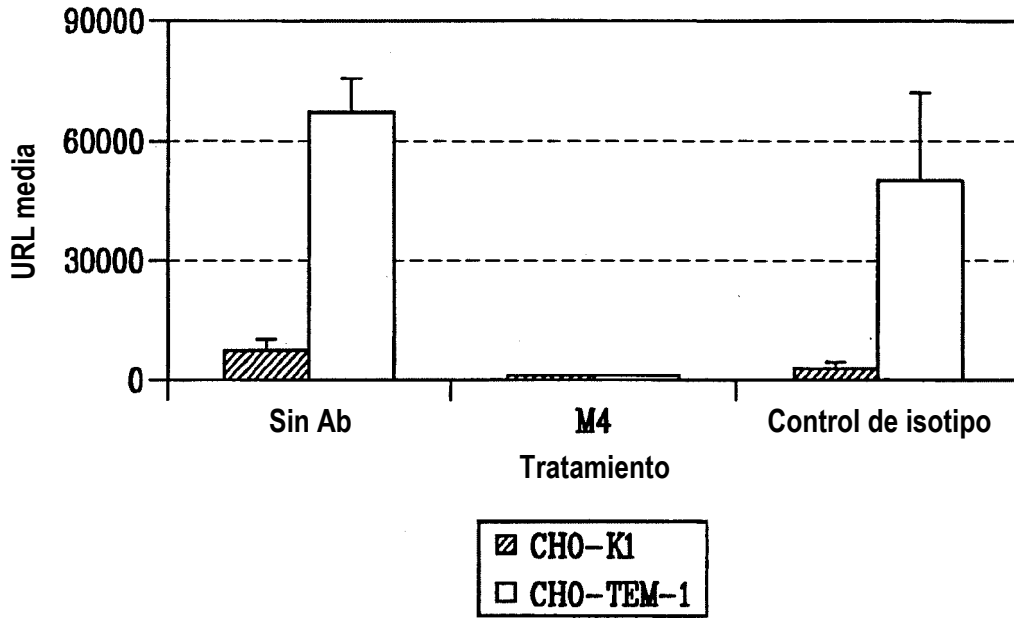


*FIG. 10*

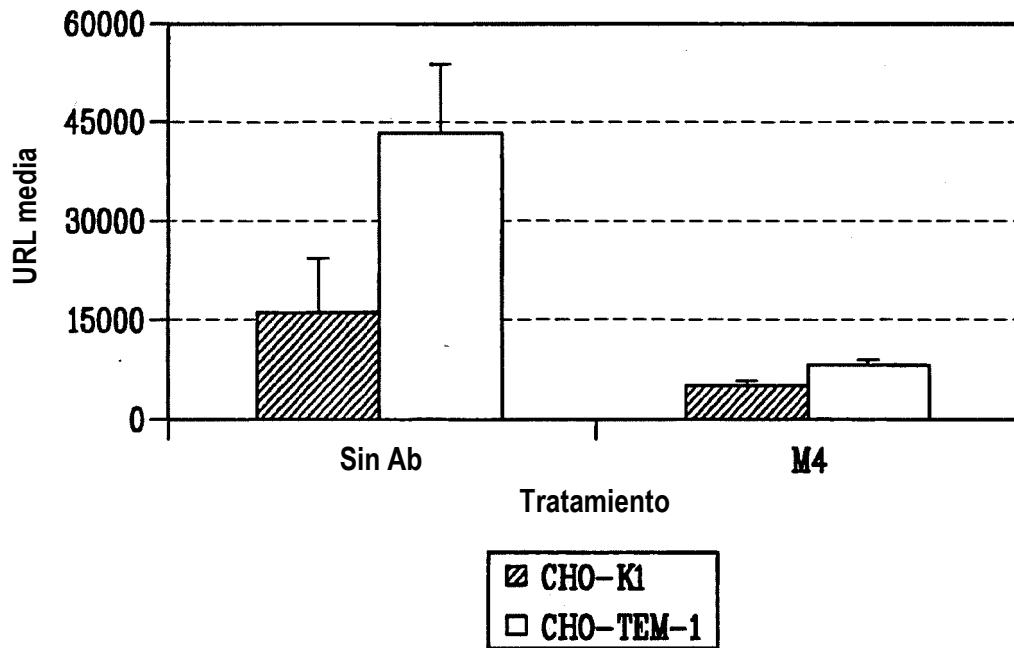
Endosialina incrementa la adhesión celular a colágeno  
Adhesión de CHOK1 y CHOTEM1 a una placa revestida con COL I



*FIG. 11*

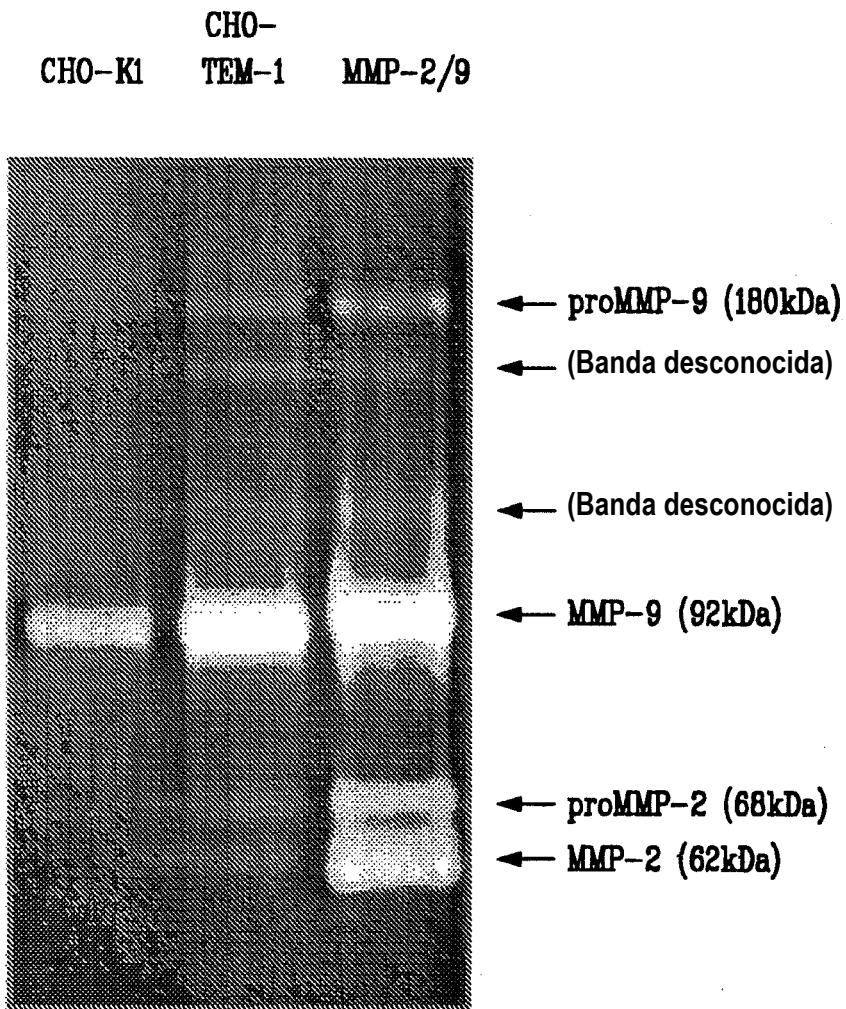


*FIG. 12A*

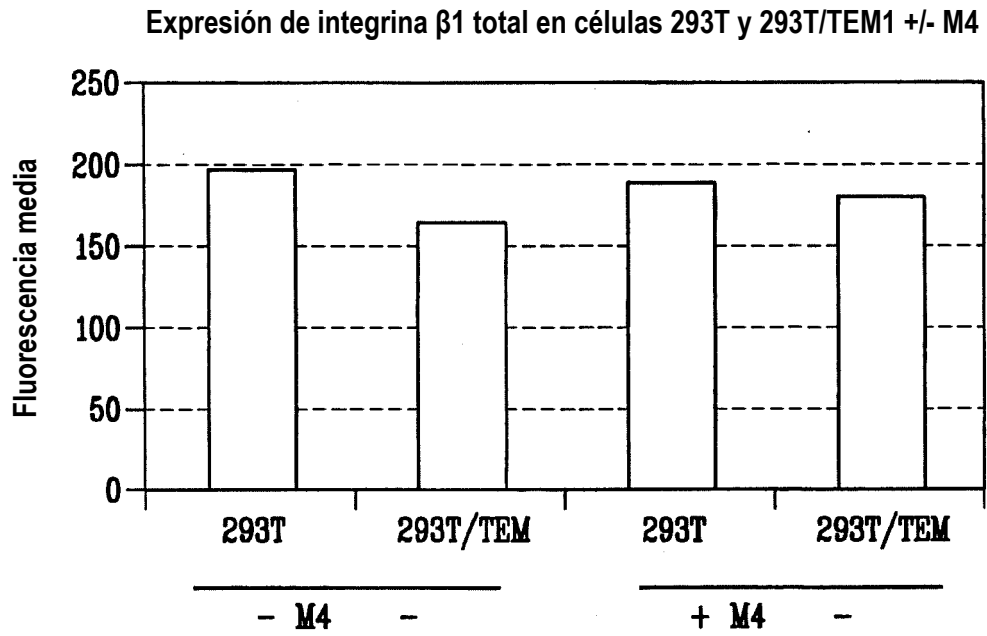


*FIG. 12B*

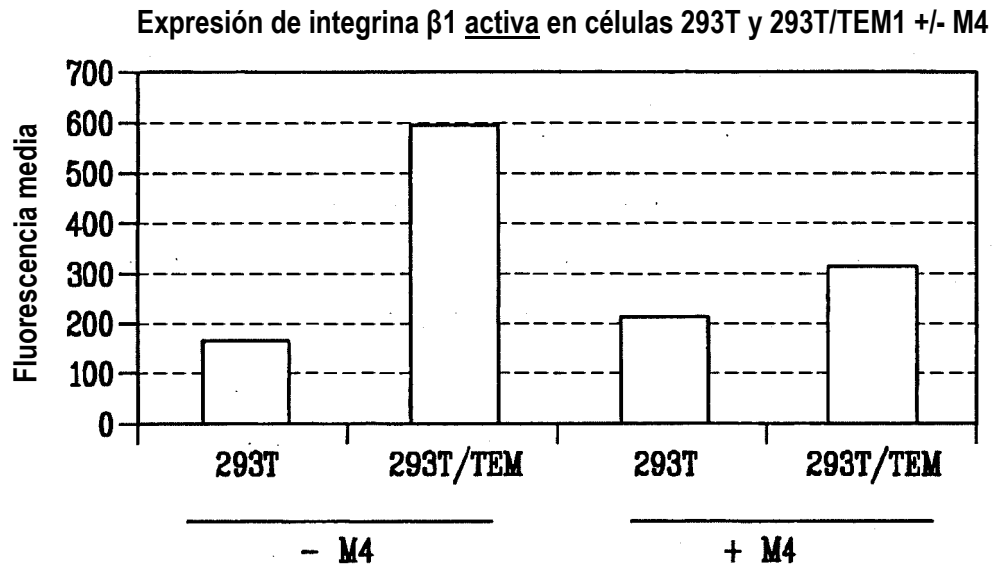




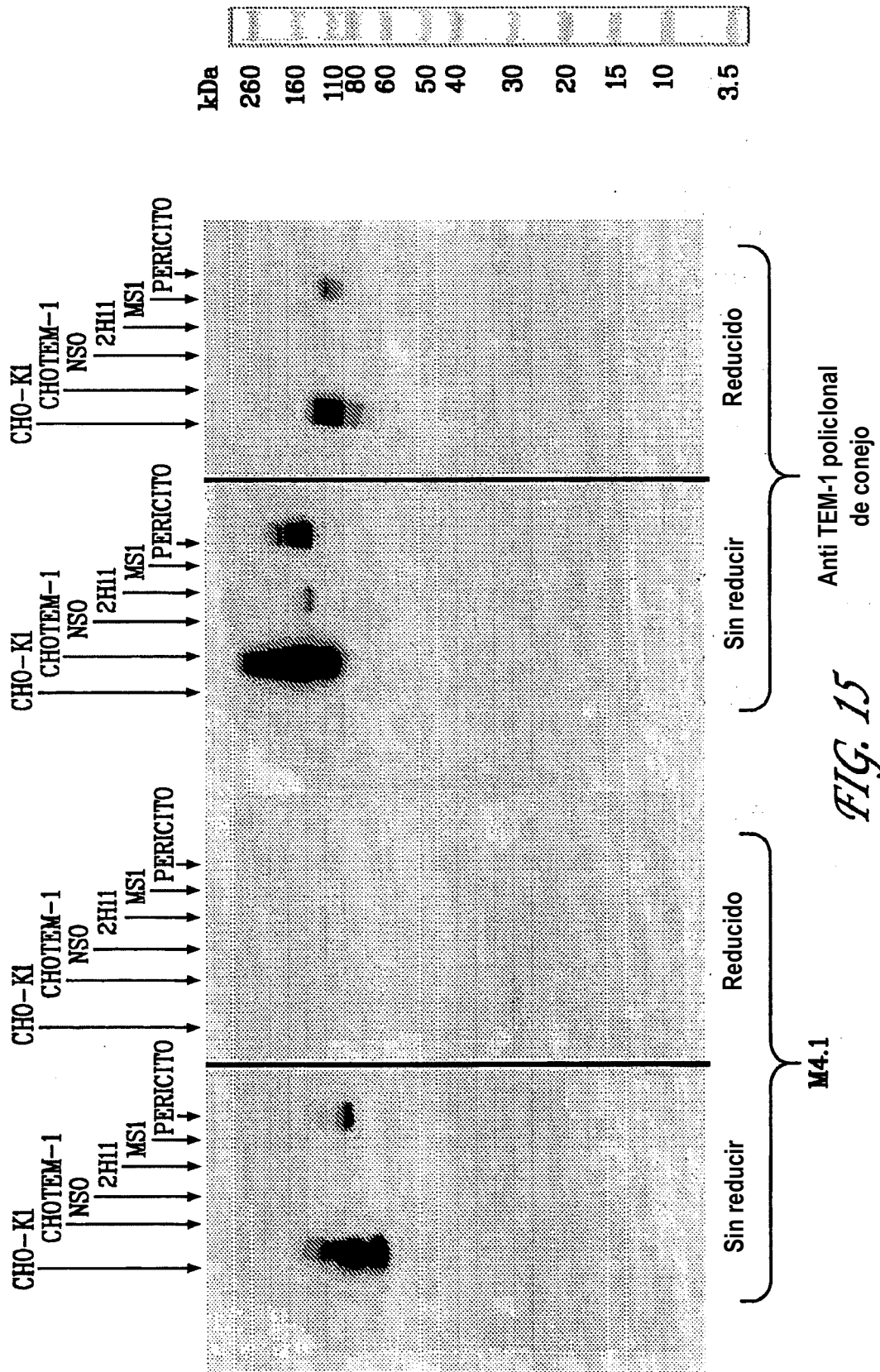
*FIG. 13*



*FIG. 14A*



*FIG. 14B*



*FIG. 15*