

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 072**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2009 E 09723224 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2269071**

54 Título: **Procedimientos y agentes para el diagnóstico y el tratamiento de carcinoma hepatocelular**

30 Prioridad:

19.03.2008 US 69910 P

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

19.01.2015

73 Titular/es:

**CHINA SYNTHETIC RUBBER CORPORATION
(100.0%)**

**8th Floor, No. 113, Section 2, Zhongshan North
Rd., Taipei 104
Taiwan, TW**

72 Inventor/es:

**KAO, KUO-JANG y
HUANG, ANDREW T.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 527 072 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

Procedimientos y agentes para el diagnóstico y el tratamiento de carcinoma hepatocelular

Antecedentes de la invención

5 El carcinoma hepatocelular (HCC) es el tumor maligno primario más frecuente del hígado y es el quinto cáncer más común en los seres humanos en todo el mundo. El HCC también es la cuarta causa principal de muerte relacionada con cáncer (Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;94:153-156). En 1990, la Organización Mundial de la Salud estimó que había aproximadamente 430.000 nuevos casos de cáncer de hígado en todo el mundo, y que un número similar de pacientes murió ese año como consecuencia de esta enfermedad.

10 La patogénesis de HCC se ha asociado con infecciones por el virus de la hepatitis crónica B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC), así como afecciones inducidas por cirrosis del hígado (Bruix J, y col. *J Hepatol.* 35: 421-430, 2001; Bruix J, y col. *Cancer Cell* 5: 215-219, 2004). Por consiguiente, la incidencia de HCC es más alta en los países del este de Asia, como China, Hong Kong, Taiwán, Corea y Japón, donde las infecciones por VHB y el VHC son más frecuentes (Bruix J, y col. *Cancer Cell.* 5: 215-219, 2004; Haskell CM. Capítulo 46 Hígado: Historia Natural, Diagnóstico y Estadificación en "Cancer Treatment" 5ª edición, W. B. Saunders Company, Philadelphia, editores: Haskell CM y Berek JS). Sin embargo, la incidencia de HCC en los países occidentales es cada vez mayor (Parkin DM, y col. *Int J Cancer* 94: 153-156, 2001). Durante la última década en los Estados Unidos, el HCC presentó el segundo mayor aumento en la incidencia, y el mayor aumento en la tasa de mortalidad, de todos los cánceres (*Ann Int Med* 139: 817-823, 2003). Por tanto, en los Estados Unidos y en todo el mundo, el HCC es una causa importante de mortalidad y morbilidad, y una importante carga económica debido a los costes de hospital y la pérdida de trabajo por personas con HCC.

El control exitoso de HCC requiere un diagnóstico correcto de la enfermedad en una fase temprana de progresión de la enfermedad. Sin embargo, distinguir los pequeños tumores de HCC de otras enfermedades hepáticas malignas o no malignas, incluyendo tumores metastásicos, colangiocarcinoma, hiperplasia nodular focal, nódulos hepáticos displásicos y regeneradores, usando las técnicas actuales, tales como estudios de imagen, biopsia con aguja gruesa y/o aspiración con aguja fina, ha demostrado ser un reto (Ferrell LD, y col. *Am J Surg Pathol* 17: 1113-1123, 1993; Horigome H, y col. *Hepato-Gastroenterology* 47: 1659-1662, 2000; Kalar S, y col. *Arch Pathol. Lab Med* 131: 1648-1654, 2007; Seki S, y col. *Clin Cancer Res* 6: 3460-3473, 2000). Además, los intentos por tratar terapéuticamente HCC han tenido muy poco éxito (Bruix J, y col. *J Hepatol* 35: 421-430, 2001; Bruix J, y col. *Cancer Cell.* 5: 215-219, 2004; Haskell CM Capítulo 46 Hígado: Historia Natural, Diagnóstico y Estadificación en "Cancer Treatment" 5ª edición, W. B. Saunders Company, Philadelphia, editores: Haskell CM y Berek JS; Szklaruk J, y col. *AJR* 180: 441-453, 2003). Como resultado, a pesar de la terapia activa, la tasa de supervivencia a 5 años de pacientes con HCC en los Estados Unidos es sólo del 10,5%, que es la segunda en magnitud sólo para cáncer de páncreas (*ACS Cancer Facts & Figures* (2007)). Por tanto, existe una necesidad urgente de identificar un marcador más fiable para diferenciar HCC de otras patologías hepáticas y facilitar la detección precoz de esta enfermedad. Además, existe una necesidad urgente de desarrollar agentes terapéuticos nuevos y más eficaces para el tratamiento de HCC.

El documento WO 03/024392 desvela que la vasculatura asociada al tumor en carcinomas hepatocelulares era fuertemente positiva para hibridación *in situ* de TAT215, correspondiente a la presente SEC ID N° 23.

Sumario de la invención

40 La materia objeto de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar un carcinoma hepatocelular (HCC) en un sujeto (por ejemplo, un ser humano), que comprende detectar el nivel de proteína PLVAP en una muestra del sujeto y determinar que el nivel de la proteína PLVAP en la muestra está aumentado respecto a un control. De acuerdo con la invención, un nivel aumentado de la proteína PLVAP en la muestra respecto al control es indicativo de la presencia de HCC en el sujeto. Se usa un anticuerpo que se une específicamente a PLVAP para detectar el nivel de una proteína PLVAP en una muestra del sujeto.

En otra realización más, la invención se refiere a un procedimiento *in vivo* para detectar HCC en un sujeto (por ejemplo, un ser humano), que comprende administrar un anticuerpo marcado con radioisótopo que se une específicamente a PLVAP por inyección intra-arterial o intravenosa, obtener una imagen del hígado del sujeto y detectar la acumulación del anticuerpo en el hígado del sujeto. De acuerdo con la invención, la detección de la acumulación del anticuerpo en el hígado es indicativa de HCC en el sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa un algoritmo para la identificación de genes que muestran expresión diferencial extrema entre tejidos tumorales y tejidos no tumorales adyacentes.

55 La FIG. 2 es un gráfico que representa intensidades de expresión de genes PLVAP en muestras de tejido hepático HCC (PHCC) y no tumoral adyacente (PN) emparejadas (n = 18), así como muestras de HCC no

emparejadas (n = 82) determinadas por perfilado de transcritos de ARNm usando chips génicos Affymetrix.

La FIG. 3A es un gráfico que representa las cantidades relativas de expresión de PLVAP en muestras de tejido hepático HCC (PHCC) y no tumoral adyacente (PN) emparejadas determinadas por RT-PCR cuantitativa Taqman. Los niveles de ARNm de PLVAP son significativamente superiores en tejidos hepáticos HCC respecto a no tumorales.

La FIG. 3B es un gráfico que representa las intensidades de expresión de genes PLVAP en 18 muestras de tejido hepático HCC (PHCC) y no tumoral adyacente (PN) emparejadas determinadas por análisis de microseries. Los niveles de transcrito de PLVAP fueron mayores en tejido hepático HCC que en el no tumoral adyacente de cada individuo para todos los individuos estudiados, excepto uno.

Las FIG. 4A y 4B muestran la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N° 2) de la proteína de fusión recombinante PLVAP₅₁₋₄₄₂ humana marcada con His usada para generar antisueros policlonales de ratón anti-PLVAP.

La FIG. 5 es una imagen de una transferencia de Western que representa la detección de la proteína PLVAP recombinante antes y después de digestión con trombina para eliminar la marca His. Las flechas a la izquierda de la transferencia indican las posiciones de His-PLVAP y PLVAP en la transferencia. Los números a la izquierda de la transferencia indican las posiciones de patrones de peso molecular.

La FIG. 6A es un gráfico que representa la presencia de cantidades relativas significativas de ARNm de PLVAP en células endoteliales HCC obtenidas por microdissección de captura láser de dos muestras de tejido HCC (muestra A (negro) y muestra B (gris)) determinadas por RT-PCR cuantitativa en tiempo real de dos etapas. Las líneas discontinuas representan señales de RT-PCR cuantitativa Taqman de ARNm de beta-actina en las mismas muestras usadas para RT-PCR cuantitativa de ARNm de PLVAP. Los resultados indican la presencia de ARNm de PLVAP fácilmente medible en las células endoteliales diseccionadas (líneas continuas).

La FIG. 6B es un gráfico que representa la ausencia de cantidades relativas significativas de ARNm de PLVAP en células obtenidas por microdissección de captura láser de tejido hepático no tumoral adyacente a tejido HCC en dos muestras de HCC (muestra A (negro) y muestra B (gris)) determinadas por RT-PCR cuantitativa en tiempo real Taqman de dos etapas. Los resultados indican que no hay ARNm de PLVAP detectable (línea continua negra) y apenas detectable (línea gris continua) en las células diseccionadas.

La FIG. 6C es un gráfico que representa las cantidades relativas de ARNm de PLVAP en células tumorales HCC obtenidas por microdissección de captura láser de dos muestras de tejido HCC (muestra A (negro) y muestra B (gris)) determinadas por RT-PCR cuantitativa en tiempo real Taqman de dos etapas. Los resultados indican la presencia de cantidades muy pequeñas de ARNm de PLVAP (líneas continuas) en las células HCC diseccionadas debido a la inevitable contaminación minoritaria de la parte de células endoteliales vasculares unidas a las células HCC diseccionadas.

La FIG. 7 es un gráfico que representa el título de anticuerpos anti-PLVAP en antisuero de ratón producido contra proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ recombinante determinado por ELISA.

Las FIG. 8A-8F son imágenes que muestran secciones de tejidos hepáticos HCC (FIG. 8A, 8C, 8E) y no tumorales adyacentes (FIG. 8B, 8D, 8F) emparejados fijado en formalina de tres pacientes con carcinoma hepatocelular que se tiñeron inmunohistoquímicamente usando antisueros policlonales anti-PLVAP para detectar la localización de la proteína PLVAP. Los tejidos emparejados se muestran en las FIG. 8A, 8B; las FIG. 8C, 8D; y las FIG. 8E, 8F. La proteína PLVAP, que aparece como una mancha marrón (flechas) en las imágenes de HCC, se detectó sólo en las células endoteliales capilares de carcinomas hepatocelulares (FIG. 8A, 8C, 8E). No estuvo presente HCC detectable en tejido hepático no tumoral (FIG. 8B, 8D, 8F).

Las FIG. 9A-9F son imágenes que muestran secciones de tejidos hepáticos HCC (FIG. 9A, 9C, 9E, 9F) y no tumorales (FIG. 9B, 9D) fijados en formalina de tres pacientes adicionales con carcinoma hepatocelular que se tiñeron inmunohistoquímicamente usando antisueros policlonales anti-PLVAP para detectar la localización de la proteína PLVAP. Las FIG. 9A, 9B y las FIG. 9C, 9D muestran muestras tisulares emparejadas de tejido hepático HCC y no tumoral adyacente. La proteína PLVAP, que aparece como una mancha marrón (flechas) en las imágenes de HCC, se detectó sólo en las células endoteliales capilares de carcinomas hepatocelulares (FIG. 9A, 9C, 9E, 9F). No estuvo presente HCC detectable en tejido hepático no tumoral (FIG. 9B, 9D).

Las FIG. 10A-10F son imágenes que muestran secciones de tejidos de hiperplasia nodular focal fijados en formalina de seis pacientes diferentes que se tiñeron inmunohistoquímicamente usando antisueros policlonales anti-PLVAP para detectar la localización de la proteína PLVAP. La proteína PLVAP no se detectó en células endoteliales que revisten los sinusoides/capilares vasculares de tejidos hepáticos no tumorales de hiperplasia nodular focal. Se observó algo de tinción positiva (marrón) en células epiteliales de los conductos biliares (Fig. 10A, 10D y 10F) y los vasos de los espacios porta (Fig. 10D y 10F), pero no en las células endoteliales del parénquima hepático. La tinción positiva de las células epiteliales del conducto biliar se debía a la unión de anticuerpos no específicos en el antisuero contra PLVAP.

Las FIG. 11A y 11B son imágenes que muestran secciones de tejido fijado en formalina de dos pacientes con hemangioma hepático que se tiñeron inmunohistoquímicamente con antisuero policlonal anti-PLVAP. Las células de revestimiento endotelial de hemangioma hepático no mostraron expresión significativa de proteína PLVAP.

Las FIG. 12A y 12B son imágenes que muestran secciones de tejido fijado en formalina de dos pacientes con hepatitis B crónica activa que se tiñeron inmunohistoquímicamente con antisuero policlonal anti-PLVAP. No se detectó proteína PLVAP en las células endoteliales que revisten los sinusoides/capilares vasculares de los tejidos hepáticos no tumorales de pacientes con hepatitis B crónica.

Las FIG. 13A-13D son imágenes que muestran secciones de tejido fijado en formalina de tres pacientes diferentes con hepatitis C crónica activa que se tiñeron inmunohistoquímicamente con antisuero policlonal anti-

PLVAP. Las secciones tisulares mostradas en las FIG. 13B y 13D son del mismo paciente. No se detectó proteína PLVAP en las células endoteliales que revisten los vasculares/capilares sinusoides de los tejidos hepáticos no tumorales de pacientes con hepatitis C crónica.

Las FIG. 14A-14D son imágenes que muestran secciones de tejido fijado en formalina de tres pacientes diferentes con cáncer de hígado metastásico que se tiñeron inmunohistoquímicamente con antisuero policlonal anti-PLVAP. Las secciones tisulares son de pacientes con adenocarcinoma colorrectal metastásico (FIG. 14A), colangiocarcinoma intrahepático (FIG. 14B y 14C) o carcinoma de ovario metastásico (FIG. 14D). Las secciones tisulares mostradas en las FIG. 14B y 14C son del mismo paciente. No se detectó proteína PLVAP en las células endoteliales que revistes los sinusoides/capilar vasculares de los tejidos de cáncer metastásico.

La FIG. 15A muestra las secuencias génica de nucleótidos (parte superior) (SEC ID N° 3) y deducida de aminoácidos (medio) (SEC ID N° 4) del dominio V_H del anticuerpo monoclonal KFCC-GY4. La secuencia de restos de aminoácido en las CDR 1 (SEC ID N° 5), 2 (SEC ID N° 6) y 3 (SEC ID N° 7) también están indicadas (parte inferior).

La FIG. 15B muestra las secuencias génica de nucleótidos (parte superior) (SEC ID N° 8) y deducida de aminoácidos (medio) (SEC ID N° 9) del dominio V_L del anticuerpo monoclonal KFCC-GY4. La secuencia de restos de aminoácido en las CDR 1 (SEC ID N° 10), 2 (SEC ID N° 11) y 3 (SEC ID N° 12) también están indicadas (parte inferior).

La FIG. 16A muestra las secuencias génica de nucleótidos (parte superior) (SEC ID N° 13) y deducida de aminoácidos (medio) (SEC ID N° 14) del dominio V_H del anticuerpo monoclonal KFCC-GY5. La secuencia de restos de aminoácido en las CDR 1 (SEC ID N° 15), 2 (SEC ID N° 16) y 3 (SEC ID N° 17) también están indicadas (parte inferior).

La FIG. 16B muestra las secuencias génica de nucleótidos (parte superior) (SEC ID N° 18) y deducida de aminoácidos (medio) (SEC ID N° 19) del dominio V_L del anticuerpo monoclonal KFCC-GY5. La secuencia de restos de aminoácido en las CDR 1 (SEC ID N° 20), 2 (SEC ID N° 21) y 3 (SEC ID N° 22) también están indicadas (parte inferior).

La FIG. 17 es un gráfico que representa la unión de los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 (círculos abiertos) y KFCC-GY5 (círculos rellenos) a la proteína PLVAP recombinante a diversas concentraciones de anticuerpo, determinada por ELISA.

La FIG. 18 es una inmunotransferencia que muestra que los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 pueden detectar 5 ng de proteína PLVAP recombinante. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal KFCC-GY4; Carril 3: inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal KFCC-GY5. El peso molecular de la proteína PLVAP recombinante es 45 kDa.

Las FIG. 19A y 19C son geles de SDS acrilamida teñidos de azul de Coomassie. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: proteínas hidrófobas de membrana extraídas con TX-114 de células del endotelio vascular de cordón umbilical humano que se habían estimulado con VEGF (40 ng/ml) durante 72 horas antes de la extracción.

La FIG. 19B es una inmunotransferencia, en la que el extracto mostrado en el carril 2 de la FIG. 19A se sondeó con anticuerpos monoclonales KFCC-GY4. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: proteínas hidrófobas de membrana extraídas con TX-114 de células del endotelio vascular de cordón umbilical humano que se habían estimulado con VEGF (40 ng/ml) durante 72 horas antes de la extracción.

La FIG. 19D es una inmunotransferencia, en la que el extracto mostrado en el carril 2 de la FIG. 19C se sondeó con anticuerpos monoclonales KFCC-GY-5. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: proteínas hidrófobas de membrana extraídas con TX-114 de células del endotelio vascular de cordón umbilical humano que se habían estimulado con VEGF (40 ng/ml) durante 72 horas antes de la extracción.

La FIG. 20A es una micrografía de fluorescencia que muestra la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) con el IgG de ratón normal de control. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Aumento = 600x.

La FIG. 20B es una micrografía de fluorescencia que muestra la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) con anticuerpo monoclonal contra el factor de von Willebrand (VWF). VWF es un marcador positivo para las células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Aumento = 600x.

La FIG. 20C es una micrografía de fluorescencia que muestra la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) con anticuerpo monoclonal KFCC-GY4 contra PLVAP. Los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 anti-PLVAP reaccionaron positivamente con células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Aumento = 600x.

La FIG. 20D es una micrografía de fluorescencia que muestra la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) con anticuerpo monoclonal KFCC-GY5 contra PLVAP. Los anticuerpos monoclonales KFCC-GY5 anti-PLVAP reaccionaron positivamente con células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Aumento = 600x.

La FIG. 21A es una micrografía óptica de una sección de tejido de hepatoma fijado en formalina incrustado en un bloque de parafina, que se tiñó con anticuerpos monoclonales KFCC-GY5 anti-PLVAP. Se detectó una potente señal PLVAP (mancha gris oscuro) en células endoteliales vasculares de hepatoma. El aumento es 100X.

La FIG. 21B es una micrografía óptica de una sección de tejido de hepatoma fijado en formalina del mismo paciente que la muestra mostrada en la FIG. 21A, que se tiñó con anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 anti-PLVAP. Se detectó una señal moderada PLVAP (mancha gris claro) en células endoteliales vasculares de hepatoma. El aumento es 100X.

La FIG. 21C es una micrografía óptica de una sección de tejido de hepatoma fijado en formalina de un paciente diferente de las muestras mostradas en las FIG. 21A y 21B, que se tiñó con anticuerpos monoclonales KFCC-GY5 anti-PLVAP. Se detectó una potente señal PLVAP (mancha gris oscuro) en células endoteliales vasculares. El aumento es 100X.

La FIG. 21D es una micrografía óptica de una sección de tejido de hepatoma fijado en formalina del mismo paciente que la muestra mostrada en la FIG. 21C incrustado en un bloque de parafina, que se tiñó con anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 anti-PLVAP. Se detectó una señal moderada PLVAP (mancha gris claro) en células endoteliales vasculares, lo que indica que los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 se unen al antígeno PLVAP peor que los anticuerpos KFCC-GY5. El aumento es 100X.

Las FIG. 22A-H son micrografías ópticas de secciones de tejidos de hepatoma (FIG. 22A, 22C, 22E y 22G) y tejidos hepáticos no tumorales adyacentes (FIG. 22B, 22D, 22F y 22H) de cuatro pacientes diferentes de hepatoma seleccionados aleatoriamente. Las secciones se tiñeron con anticuerpos monoclonales KFCC-GY5 anti-PLVAP. Se detectó señal PLVAP (mancha gris) en células endoteliales vasculares del tejido de hepatoma, pero no en células endoteliales vasculares de tejido hepático no tumoral. El aumento es 100X. Las FIG. 22A y 22B, 22C y 22D, 22E y 22F, y 22G y 22H representan los cuatro conjuntos de tejidos hepáticos de hepatoma y no tumorales emparejados.

La FIG. 23A es una micrografía de fluorescencia que muestra células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) que se tiñeron con IgG de ratón de control. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

La FIG. 23B es una micrografía de fluorescencia que muestra células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) que se tiñeron con anticuerpo monoclonal KFCC-GY4 contra PLVAP. Los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 anti-PLVAP reaccionaron positivamente con las superficies de las células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

La FIG. 23C es una micrografía de fluorescencia que muestra células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) que se tiñeron con anticuerpo monoclonal KFCC-GY5 contra PLVAP. Los anticuerpos monoclonales KFCC-GY5 anti-PLVAP reaccionaron positivamente con las superficies de las células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

La FIG. 24 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína PLVAP humana (Nº de acceso a GenBank NP_112600; SEC ID Nº 23).

Las FIG. 25A y 25B muestran la secuencia de nucleótidos del ADNc de PLVAP humana de longitud completa (nº de acceso a GenBank NM_031310; SEC ID Nº 24).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se usa en el presente documento, la expresiones "proteína asociada a vesículas de plasmalema", "PLVAP" y "PV-1" se refieren a una proteína PLVAP de origen natural o endógena (por ejemplo, de mamífero, humana), y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es igual o sustancialmente igual que la proteína PLVAP de origen natural o endógena (por ejemplo, proteínas recombinantes, proteínas sintéticas). Por consiguiente, la expresiones "proteína asociada a vesículas de plasmalema", "PLVAP" y "PV-1", que se usan de manera intercambiable en el presente documento, incluyen variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas de una proteína PLVAP producida por, por ejemplo, corte y ajuste alternativo u otros procesos celulares, que ocurren de forma natural en mamíferos (por ejemplo, seres humanos). Preferentemente, la proteína PLVAP es una proteína humana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 23 (véase, nº de acceso a Genbank NP_112600 y FIG. 24).

Como se define en el presente documento, un "antagonista de PLVAP" es un agente (por ejemplo, anticuerpo, molécula pequeña, péptido, peptidomimético, ácido nucleico) que, en una realización, inhibe (por ejemplo, reduce, evita) una actividad de una proteína PLVAP; o, en otra realización, inhibe (por ejemplo, reduce, evita) la expresión de un gen PLVAP y/o el producto génico. Las actividades de una proteína PLVAP que pueden inhibirse por un antagonista de la invención incluyen, aunque sin limitación, la formación, crecimiento, vascularización y/o progresión de un tumor de carcinoma hepatocelular. En una realización particular, el antagonista de PLVAP se une específicamente a una proteína PLVAP de mamífero (por ejemplo, humana) e inhibe una actividad de la proteína PLVAP.

Como se usa en el presente documento, "se une específicamente" se refiere a la unión de un agente (por ejemplo, un anticuerpo) a un producto génico PLVAP (por ejemplo, ARN, proteína) con una afinidad (por ejemplo, una afinidad de unión) que es al menos aproximadamente 5 veces, preferentemente al menos aproximadamente 10 veces, mayor que la afinidad con la que el antagonista de PLVAP se une a una proteína no PLVAP.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no a una longitud específica. Por tanto, "polipéptido" abarca proteínas, péptidos, y oligopéptidos.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que tiene afinidad por una diana, antígeno, o epítipo, e incluye anticuerpos tanto de origen natural como modificados por ingeniería. El término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales, monoclonales, humanos, quiméricos, humanizados, primatizados, revestidos, y anticuerpos de cadena sencilla, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fv, Fc, Fd, Fab,

Fab', F(ab'), scFv, scFab, dAb). (Véase por ejemplo, Harlow y col., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

5 La expresión "región variable de anticuerpo" se refiere a la región de un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo (por ejemplo, V_H , V_{HH} , V_L), ya sea independientemente o combinada con regiones variables de otro anticuerpo (por ejemplo, un par V_H/V_L).

El término "epítopo" se refiere a una unidad de estructura unida convencionalmente por un par V_H/V_L de anticuerpo. Un epítopo define el sitio de unión mínimo para un anticuerpo y, por tanto, representa la diana de especificidad de un anticuerpo.

10 La expresión "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a una región hipervariable de una región variable de anticuerpo de una cadena pesada o cadena ligera, que contiene secuencias de aminoácidos capaces de unirse específicamente a una diana antigénica (por ejemplo, un epítopo). Una cadena pesada o ligera típica tendrá tres CDR (CDR1, CDR2, CDR3), que representan la especificidad del anticuerpo por un epítopo particular.

15 Como se define en el presente documento, la expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una parte de un anticuerpo que contiene una o más CDR y tiene afinidad por un determinante antigénico por sí misma. Ejemplos no limitantes incluyen fragmentos Fab, fragmentos $F(ab)_2$, dímeros de cadena pesada-ligera, y estructuras de cadena sencilla, tales como una cadena ligera completa o una cadena pesada completa.

Como se usa en el presente documento, el término "especificidad" se refiere a la capacidad de un anticuerpo de unirse preferentemente a un epítopo, y no implica necesariamente alta afinidad.

20 El término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo y un determinante antigénico. La afinidad depende de varios factores, incluyendo la cercanía de ajuste estereoquímico entre el anticuerpo y el determinante antigénico, el tamaño de la zona de contacto entre ellos, y la distribución de grupos cargados e hidrófobos.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "constante de afinidad" o " K_d " se refiere a una constante de disociación usada para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. Cuanto menor sea la constante de afinidad, mayor será la afinidad de la inmunoglobulina por el antígeno o determinante antigénico y viceversa. Dicha constante se calcula fácilmente a partir de las constantes de velocidad para las reacciones de asociación-disociación medidas mediante metodología cinética convencional para reacciones de anticuerpos.

30 Como se menciona en el presente documento, el término "compite" significa que la unión de un primer polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) a un antígeno diana se inhibe por la unión de un segundo polipéptido (por ejemplo, anticuerpo). Por ejemplo, la unión puede inhibirse estéricamente, por ejemplo mediante bloqueo físico de un dominio de unión o por alteración de la estructura o entorno de un dominio de unión de tal manera que su afinidad o avidez por una diana se reduzca.

35 Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a un compuesto que consiste en de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 restos de aminoácido en el que el grupo amino de un aminoácido está unido al grupo carboxilo de otro aminoácido por un enlace peptídico. Dichos péptidos son típicamente de menos de aproximadamente 100 restos de aminoácido de longitud y preferentemente son de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40 o aproximadamente 50 restos.

40 Como se usa en el presente documento, el término "peptidomimético" se refiere a moléculas que no son péptidos o proteínas, pero que imitan aspectos de sus estructuras. Pueden prepararse antagonistas peptidomiméticos por procedimientos químicos convencionales (véase por ejemplo, Damewood J.R. "Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry" en *Reviews in Computational Biology*, 2007, Vol. 9, pág. 1-80, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1996; Kazmierski W.K., "Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols," Humana Press, Nueva Jersey, 1999).

45 Las expresiones "carcinoma hepatocelular", "HCC", y "hepatoma" se usan indistintamente en el presente documento para referirse al cáncer que surge de los hepatocitos, el principal tipo de células del hígado.

Como se define en el presente documento, "terapia" es la administración de un agente terapéutico o profiláctico particular a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, un ser humano), que provoca un beneficio terapéutico o profiláctico deseado al sujeto.

50 Como se define en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para conseguir el efecto terapéutico o profiláctico deseado en las condiciones de administración, tal como una cantidad suficiente para inhibir (es decir, reducir, evitar) la formación de tumores, el crecimiento tumoral (proliferación, tamaño), la vascularización del tumor y/o la progresión tumoral (invasión, metástasis) en el hígado de un paciente con HCC. La eficacia de una terapia (por ejemplo, la reducción/eliminación de un tumor y/o prevención del crecimiento del tumor) puede determinarse por cualquier procedimiento adecuado (por ejemplo, inmunohistoquímica

55

in situ, formación de imágenes (ultrasonido, TC, RM, RMN), incorporación de ³ H-timidina).

Como se define en el presente documento un "régimen de tratamiento" es un régimen en el que uno o más agentes terapéuticos o profilácticos se administran a un sujeto mamífero en una dosis particular (por ejemplo, nivel, cifra, cantidad) y en un programa particular o a intervalos particulares (por ejemplo, minutos, días, semanas, meses).

5 Como se usa en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un sujeto mamífero. La expresión "sujeto mamífero" se define en el presente documento para incluir mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedoras o murinas. Ejemplos de sujetos adecuados incluyen, aunque sin limitación, pacientes humanos que tienen o están en riesgo de desarrollar, HCC. Ejemplos de grupos de alto riesgo para el desarrollo de HCC incluyen individuos con infección crónica de hepatitis (hepatitis B, hepatitis C) e individuos que tienen cirrosis del hígado, o afecciones hepáticas relacionadas.

15 Los términos "prevenir", "que previene" o "prevención", como se usa en el presente documento, significan reducir de la probabilidad/posibilidad o riesgo de formación o progresión de tumores HCC por un sujeto, retardar la aparición de una afección relacionada con HCC en el sujeto, disminuir de la gravedad de uno o más síntomas de una afección relacionada con HCC en el sujeto, o cualquier combinación de los mismos. En general, el objeto de un régimen preventivo muy probablemente se clasificará como "en riesgo", por ejemplo, el riesgo del sujeto de desarrollar HCC es mayor que el riesgo de un individuo representado por la población inicial relevante.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" significan contrarrestar una afección médica (por ejemplo, una afección relacionada con HCC) en la medida en que la afección médica se mejora de acuerdo a un estándar clínicamente aceptable (por ejemplo, número y/o tamaño reducido de tumores HCC en el hígado de un sujeto).

25 Como se usa en el presente documento, las expresiones "rigurosidad baja", "rigurosidad media", "rigurosidad alta" o "condiciones de rigurosidad muy alta" describen condiciones para la hibridación y lavado de ácidos nucleicos. Pueden encontrarse directrices para realizar de reacciones de hibridación en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1989), 6.3.1-6.3.6. Se describen procedimientos acuosos y no acuosos en esa referencia y puede usarse cualquiera de ellos. Las condiciones de hibridación específicas mencionadas en el presente documento son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de rigurosidad baja en cloruro sódico/citrato sódico (SSC) 6X a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse hasta 55°C para condiciones de rigurosidad baja); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% a 60°C; (3) condiciones de hibridación de rigurosidad alta en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% a 65°C; y preferentemente (4) condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta son fosfato sódico 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 1% a 65°C. Las condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferidas y las que deben usarse salvo que se especifique lo contrario.

35 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el habitualmente entendido por un especialista en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas convencionales para procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase en líneas generales, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc.) y procedimientos químicos.

PLVAP

45 La proteína asociada a vesículas de plasmalema (PLVAP), también conocida como PV1, es una glicoproteína de membrana integral de tipo II cuya expresión está restringida a ciertas células endoteliales vasculares (Mol Cell Biol 15: 3.615-3630 (2004)). La PLVAP ha demostrado ser un componente estructural clave de los diafragmas fenestrales y estomas de endotelios fenestrados *Id*. Además, la expresión de PLVAP es necesaria para la formación de diafragmas fenestrales endoteliales y puede estar implicada en la modulación de la permeabilidad y el transporte endotelial (Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H1347-1353, 2004). Se ha informado de la organización genómica del gen PLVAP humano (Stan RV, Arden KC, Palade GE. cDNA and protein sequence, genomic organization, and analysis of cis regulatory elements of mouse and human PLVAP genes. Genomics 72; 304-313, 2001).

55 Como se describe en el presente documento, los inventores han demostrado que la expresión génica de PLVAP está significativamente elevada en tejidos de carcinoma hepatocelular en relación con tejidos no tumorales adyacentes en el hígado de pacientes humanos con HCC. Además, los presentes inventores han determinado que la proteína PLVAP se expresa principalmente en, y se localiza en, células endoteliales vasculares de los alrededores o dentro de tumores HCC, pero no se expresa en, o se localiza en, células asociadas con otras patologías hepáticas. Por consiguiente, la PLVAP representa una nueva diana para el diagnóstico y el tratamiento de HCC.

Procedimientos de diagnóstico y pronóstico

La presente invención abarca procedimientos de diagnóstico y pronóstico que comprenden evaluar la expresión de PLVAP en una muestra (por ejemplo, biopsia de hígado, muestra de aspiración con aguja fina) de un sujeto mamífero (por ejemplo, un sujeto mamífero que tiene un tumor en el hígado). Para los procedimientos de diagnóstico de la invención, la expresión de PLVAP en la muestra, o la expresión aumentada de PLVAP en la muestra respecto a un control adecuado, indica que el sujeto tiene HCC, y/o que el sujeto es un candidato para una terapia antineoplásica usando un antagonista de PLVAP.

Para los procedimientos de pronóstico de la invención, la expresión de PLVAP en una muestra de un sujeto, o la expresión aumentada de PLVAP en la muestra respecto a un control adecuado, indica un mal pronóstico. El pronóstico puede ser un pronóstico para la supervivencia del paciente, un pronóstico del riesgo de metástasis y/o un pronóstico del riesgo de recaída.

Las muestras adecuadas para estos procedimientos incluyen una muestra de tejido, una muestra de fluido biológico, una muestra de una o más células (por ejemplo, una célula tumoral), y similares. Cualquier medio de muestreo de un sujeto, por ejemplo, mediante extracción de sangre, punción lumbar, frotis de tejido o raspadura o biopsia de tejido puede usarse para obtener una muestra. Por tanto, la muestra puede ser una muestra de biopsia (por ejemplo, tumor, pólipo, masa (sólida, celular)), aspirado, frotis o muestra de sangre. La muestra puede ser un tejido de un hígado que tiene un tumor (por ejemplo, crecimiento canceroso) y/o células tumorales, o que se sospecha que tiene un tumor y/o células tumorales. Por ejemplo, una biopsia de tumor se puede obtener en una biopsia abierta, un procedimiento en el cual se extirpa una masa entera (biopsia por escisión) o parcial (biopsia por incisión) de un área diana. Alternativamente, una muestra de tumor puede obtenerse a través de una biopsia percutánea, un procedimiento realizado con un instrumento similar a una aguja a través de una pequeña incisión o punción (con o sin la ayuda de un dispositivo de formación de imágenes) para obtener células individuales o grupos de células (por ejemplo, una aspiración con aguja fina (FNA)) o un núcleo o fragmento de tejido (biopsia con aguja gruesa). Las muestras de biopsia se pueden examinar citológicamente (por ejemplo, frotis), histológicamente (por ejemplo, sección congelada o de parafina) o usando cualquier otro procedimiento adecuado (por ejemplo, procedimientos de diagnóstico molecular). Una muestra de tumor también se puede obtener por recogida *in vitro* de células humanas cultivadas derivadas de tejido de un individuo. Las muestras tumorales pueden, si se desea, almacenarse antes del análisis por medios adecuados de almacenamiento que conservan las proteínas y/o ácidos nucleicos de una muestra en una condición analizable, como la congelación rápida, o un régimen de congelación controlada. Si se desea, la congelación se puede realizar en presencia de un crioprotector, por ejemplo, sulfoxido de dimetilo (DMSO), glicerol o propanodiol-sacarosa. Las muestras tumorales se pueden combinar, según corresponda, antes o después de su almacenamiento con fines de análisis. La muestra de tumor puede ser de un paciente que tiene un cáncer de hígado, por ejemplo, carcinoma hepatocelular.

Los ensayos adecuados que pueden usarse para evaluar la presencia o cantidad de una PLVAP en una muestra (por ejemplo, muestra biológica) son conocidos para los especialistas en la técnica. Los procedimientos para detectar una proteína o péptido PLVAP incluyen procedimientos inmunológicos e inmunoquímicos como citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), incluyendo ensayos de quimioluminiscencia, radioinmunoensayo, inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia de Western), inmunohistoquímica (IHC), y otros procedimientos cuantitativos basados en anticuerpos (por ejemplo, ensayos basados en perlas Luminex®). Otros procedimientos adecuados incluyen, por ejemplo, espectroscopía de masas. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos contra PLVAP para determinar la presencia y/o el nivel de expresión de PLVAP en una muestra directa o indirectamente usando, por ejemplo, inmunohistoquímica (IHC). Por ejemplo, pueden tomarse secciones de parafina de una biopsia, fijarse en un portaobjetos y combinarse con uno o más anticuerpos por procedimientos adecuados. En una realización particular, la detección de la proteína PLVAP en células endoteliales vasculares que rodean los hepatocitos en una muestra es indicativa de HCC.

Procedimientos para detectar la expresión génica de PLVAP incluyen amplificación de ácido nucleico de PLVAP y/o visualización. Para detectar la expresión génica de PLVAP, puede aislarse un ácido nucleico de un individuo por procedimientos adecuados que son rutinarios en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y *col.*, 1989). El ácido nucleico aislado puede entonces amplificarse (por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (por ejemplo, PCR directa, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR con transcriptasa inversa), reacción en cadena de la ligasa, replicación de secuencia autosostenida, sistema de amplificación transcripcional, replicasa Q-Beta, o similares) y visualizarse (por ejemplo, por marcaje del ácido nucleico durante la amplificación, exposición a compuestos intercalantes/colorantes, sondas). El ARN de PLVAP (por ejemplo, ARNm) o la expresión del mismo también puede detectarse usando una sonda de ácido nucleico, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico marcada (por ejemplo, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH)) directamente en una sección de parafina de una muestra tisular tomada de, por ejemplo, una biopsia de tumor, o usando otros procedimientos adecuados. La expresión génica de PLVAP de las mismas también puede evaluarse por transferencia de Southern o en solución (por ejemplo, colorantes, sondas). Además, puede usarse un chip génico, microserie, sonda (por ejemplo, puntos cuánticos) u otro dispositivo similar (por ejemplo, sensor, nanosensor/detector) para detectar la expresión y/o la expresión diferencial de un gen PLVAP.

Un carcinoma hepatocelular puede diagnosticarse detectando la expresión de una proteína PLVAP en una muestra de un paciente. Por tanto, el procedimiento no requiere que la expresión de PLVAP en la muestra del paciente se compare con la expresión de PLVAP en un control. La presencia o ausencia de PLVAP puede determinarse por los procedimientos descritos en el presente documento u otros ensayos adecuados. En otra realización, un aumento en la expresión de PLVAP puede determinarse por comparación de la expresión de PLVAP en la muestra con la de un control adecuado. Los controles adecuados incluyen, por ejemplo, una muestra de tejido no neoplásico del individuo, células no cancerosas, células cancerosas no metastásicas, células no malignas (benignas) o similares, o un patrón de referencia conocido o determinado adecuado. El patrón de referencia puede ser un intervalo o nivel de expresión normal o normalizado típico de expresión de una proteína PLVAP (por ejemplo, un patrón de expresión). Por tanto, el procedimiento no requiere que la expresión de la proteína se evalúe en un control adecuado.

Anticuerpos contra PLVAP

Como se describe en el presente documento, los anticuerpos que se unen a PLVAP tienen utilidad en el diagnóstico y el tratamiento de HCC en sujetos humanos. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que se unen específicamente a PLVAP para detectar la presencia de PLVAP en células endoteliales capilares de carcinoma hepatocelular en muestras de biopsias centrales o aspirados con aguja de hígado por tinción inmunohistoquímica (IHC). Además, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos) contra PLVAP pueden marcarse con un indicador adecuado (por ejemplo, radioisótopo.) para la tomografía por emisión de inmuno-positrones (inmuno-PET) (Clin Cancer Res 12: 1958-1960, 2006; Clin Cancer Res 12: 2133-2140, 2006) para determinar si una o más lesiones que ocupan espacio en el hígado de un sujeto son carcinoma hepatocelular. Los anticuerpos anti-PLVAP (por ejemplo, anticuerpos humanizados) también pueden marcarse con un agente citotóxico (radiactivo o no radiactivo) con fines terapéuticos (Weiner LM, Adams GP, Von Mehren M. Therapeutic monoclonal antibodies: General principles. En: Cancer: Principles & Practice of Oncology. 6ª ed. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:495-508; Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology & Immunology. 4ª ed. Stamford: Appleton & Lange; 1996:307-47; Scheinberg DA, Sgouros G, Junghans RP. Antibody-based immunotherapies for cancer. En: Cancer Chemotherapy & Biotherapy: Principles and Practice. 3ª ed. Chabner BA, Longo DL, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:850-82).

Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une (por ejemplo, se une específicamente) a una proteína PLVAP (por ejemplo, una proteína PLVAP humana (SEC ID N° 23)). Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína PLVAP pueden ser policlonales, monoclonales, humanos, quiméricos, humanizados, primatizados, revestidos, y anticuerpos de cadena sencilla, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab'), scFv, scFab, dAb), entre otros. (Véase por ejemplo, Harlow y col., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína PLVAP pueden producirse, construirse, modificarse por ingeniería y/o aislarse por procedimientos convencionales u otras técnicas adecuadas. Por ejemplo, pueden crearse anticuerpos que son específicos para una proteína PLVAP contra un inmunógeno apropiado, tal como una proteína PLVAP de mamífero (por ejemplo, humana) recombinante (por ejemplo, SEC ID N° 23) o una parte de la misma (por ejemplo, SEC ID N° 2) (incluyendo moléculas sintéticas, por ejemplo, péptidos sintéticos). Se ha descrito una diversidad de tales procedimientos de inmunización (véase por ejemplo, Kohler y col., Nature, 256: 495-497 (1975) y Eur J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein y col., Nature 266: 550-552 (1977); Koprowski y col., patente de Estados Unidos N° 4.172.124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, verano '94), Ausubel, F.M. y col., Eds., (John Wiley & Sons: Nueva York, NY), Capítulo 11, (1991)). Los anticuerpos también se pueden crear inmunizando un huésped adecuado (por ejemplo, ratón) con células que expresan PLVAP (por ejemplo, células/líneas celulares de cáncer) o células modificadas por ingeniería para expresar PLVAP (por ejemplo, células transfectadas). (Véase por ejemplo, Chuntharapai y col., J. Immunol, 152: 1783-1789 (1994); Chuntharapai y col. patente de Estados Unidos N° 5440.021).

En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos son más altos, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos del animal inmunizado y usarse para preparar anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497, 1975), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor y col., Immunol Today 4:72, 1983), la técnica de hibridoma de EBV (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan. R. Liss, Inc., pág. 77-96, 1985) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (ver en líneas generales Current Protocols in Immunology, Coligan y col., (Eds.) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, 1994). En resumen, se fusiona una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) a linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno como se ha descrito anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se exploran para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se una a un polipéptido descrito en el presente documento.

Puede aplicarse cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas con el fin de generar un anticuerpo monoclonal contra un polipéptido de la invención (véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, supra; Galfre y col., Nature, 266: 55052, 1977; RH Kenneth, en Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York, 1980; y Lerner, Yale J. Biol. Med. 54:387-402, 1981). Además, los especialistas en la técnica apreciarán que

hay muchas variaciones de dichos procedimientos que también serían útiles.

En una alternativa a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, puede identificarse un anticuerpo monoclonal contra una proteína PLVAP y aislarse por exploración de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos) con el polipéptido diana para aislar de ese modo miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen al polipéptido. Están disponibles en el mercado kits para generar y explorar bibliotecas de presentación en fagos (por ejemplo, el Recombinant Phage Antibody System de Pharmacia, número de catálogo 27-9400-01; y el Phage Display Kit de Stratagene SurfZAP™, n° de catálogo 240612). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente susceptibles para su uso en la generación y exploración de bibliotecas de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.223.409; la publicación PCT N° WO 92/18619; la publicación PCT N° WO 91/17271; la publicación PCT N° WO 92/20791; la publicación PCT N° WO 92/15679; la publicación PCT N° WO 93/01288; la publicación PCT N° WO 92/01047; la publicación PCT N° WO 92/09690; la publicación PCT N° WO 90/02809; Fuchs y col., *Bio/Technology* 9:1370-1372, 1991; Hay y col., *Hum. Antibodies Hybridomas* 3: 81-85, 1992; Huse y col., *Science* 246: 1275-1.281, 1989; y Griffiths y col., *EMBO J.* 12: 725-734, 1993.

Pueden producirse fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂, respectivamente. También pueden usarse otras proteasas con la especificidad de sustrato necesaria para generar fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂.

También pueden producirse anticuerpos en una diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpo en que se ha introducido uno o más codones de parada cadena arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen quimérico que codifique una parte de cadena pesada F(ab')₂ para incluir secuencias de ADN que codifiquen el dominio CH₁ y la región bisagra de la cadena pesada.

También se abarcan anticuerpos de cadena sencilla, humanos, quiméricos, humanizados, primatizados (de CDR injertadas), o revestidos que comprenden partes derivadas de diferentes especies, por la presente invención y el término "anticuerpo". Las diversas partes de estos anticuerpos pueden unirse entre sí químicamente por técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, pueden expresarse ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada para producir una proteína contigua. Véase, por ejemplo, Cabilly y col., patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Cabilly y col., patente europea N° 0.125.023 B1; Boss y col., patente de Estados Unidos N° 4.816.397; Boss y col., patente europea N° 0.120.694 B1; Neuberger, M.S. y col., documento WO 86/01533; Neuberger, M.S. y col., patente europea N° 0.194.276 B1; Winter, patente de Estados Unidos N° 5.225.539; Winter, patente europea N° 0.239.400 B1; Queen y col., patente europea N° 0 451 216 B1; y Padlan, E.A. y col., documento EP 0 519 596 A1. Véase también, Newman, R. y col., *BioTechnology*, 10: 1455-1460 (1992), respecto a anticuerpos primatizados, y Ladner y col., patente de Estados Unidos N° 4.946.778 y Bird, R.E. y col., *Science*, 242: 423-426 (1988)) respecto a anticuerpos de cadena sencilla.

En una realización particular, la invención se refiere a anticuerpos quiméricos que se unen específicamente a PLVAP (por ejemplo, una proteína PLVAP humana que comprende la SEC ID N° 23). En una realización, el anticuerpo quimérico de la invención comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera (por ejemplo, cadena ligera kappa) de IgG4 humana.

En otra realización, la invención se refiere a anticuerpos humanizados que se unen específicamente a PLVAP (por ejemplo, una proteína PLVAP humana que comprende la SEC ID N° 23). Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando tecnología de ADN sintético o recombinante, usando procedimientos convencionales u otras técnicas adecuadas. Las secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADNc) que codifican regiones variables humanizadas también pueden construirse usando procedimientos de mutagénesis por PCR para alterar las secuencias de ADN que codifican una cadena humana o humanizada, tal como un molde de ADN de una región variable previamente humanizada (véase por ejemplo, Kamman, M., y col., *Nucl. Acids Res.*, 17: 5404 (1989)); Sato, K., y col., *Cancer Research*, 53: 851-856 (1993); Daugherty, B.L. y col., *Nucleic Acids Res.*, 19 (9): 2471-2476 (1991); y Lewis, A.P. y J.S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)). Usando estos u otros procedimientos adecuados, también pueden producirse fácilmente variantes. En una realización, pueden mutarse regiones variables clonadas (por ejemplo, dAb), y pueden seleccionarse las secuencias que codifican variantes con la especificidad deseada (por ejemplo, a partir de una biblioteca de fagos; véase por ejemplo, Krebber y col., documento US 5.514.548; Hoogenboom y col., documento WO 93/06213, publicado el 1 de abril 1993). También pueden producirse anticuerpos humanizados por y/u obtenerse de fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, Antitope Limited (Cambridge, RU).

Pueden usarse otros procedimientos adecuados de producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante o fragmento de unión de anticuerpo (por ejemplo, dAb) de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos), o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones). Los animales transgénicos capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, XenoMouse®

(Abgenix, Fremont, CA)) y se pueden producir usando procedimientos adecuados (véase por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Lonberg y col., patente de Estados Unidos N° 5.545.806; Surani y col., patente de Estados Unidos N° 5.545.807; Lonberg y col., documento WO 97/13852).

5 Una vez producido, un anticuerpo específico para PLVAP puede identificarse fácilmente usando procedimientos para seleccionar y aislar anticuerpos específicos que son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Paul (ed.), Fundamental Immunology, Raven Press, 1993; Getzoff y col., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Goding (ed.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Ltd., 1996; Benjamin y col., Ann. Rev. Immunol. 2:67-101, 1984. Se puede utilizar una diversidad de ensayos para detectar anticuerpos que se unan específicamente a proteínas PLVAP. Se describen ensayos ejemplares en detalle en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunolectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), dot blot o ensayos de transferencia de Western, ensayos de inhibición o competición, y ensayos tipo sándwich.

15 Los anticuerpos de la invención tienen una alta afinidad de unión por PLVAP. Dichos anticuerpos tendrán una afinidad (por ejemplo, afinidad de unión) por PLVAP, expresada como K_d , de al menos aproximadamente 10^{-7} M (por ejemplo, aproximadamente $0,4 \times 10^{-7}$ M, aproximadamente $0,6 \times 10^{-7}$ M, o mayor, por ejemplo, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, o al menos aproximadamente 10^{-10} M. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarla fácilmente un especialista en la técnica, por ejemplo, por análisis de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949). La afinidad de unión también puede determinarse usando un instrumento biosensor disponible en el mercado (BIACORE, Pharmacia Biosensor, Piscataway, N.J.), en el que la proteína se inmoviliza sobre la superficie de un chip receptor. Véase, Karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229-240, 1991 y Cunningham y Wells, J. Mol. Biol. 234: 554-563, 1993. Este sistema permite la determinación de tasas de asociación y disociación, a partir de las cuales se puede calcular la afinidad de unión y la evaluación de la estequiometría de unión.

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden incluir un marcador, tal como, por ejemplo, un marcador detectable que permite la detección del anticuerpo, y las proteínas unidas por el anticuerpo (por ejemplo, PLVAP), en una muestra biológica. Un marcador detectable es particularmente adecuado para aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, un anticuerpo PLVAP puede marcarse con un isótopo radiactivo (radioisótopo), que puede detectarse por un especialista en la técnica usando un contador gamma, un contador de centelleo o por autorradiografía u otros medios adecuados. Los isótopos que son útiles para el propósito de la presente invención incluyen, aunque sin limitación: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe y ^{75}Se .

30 Los anticuerpos de la invención también pueden marcarse con un compuesto fluorescente (por ejemplo, colorantes). Cuando el anticuerpo marcado de forma fluorescente se expone a luz de la longitud de onda apropiada, su presencia entonces puede detectarse debido a la fluorescencia del compuesto. Entre los marcadores fluorescentes más comúnmente usados están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina. Los anticuerpos de la invención también pueden marcarse usando metales que emiten fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir a la molécula de anticuerpo usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido tetraaza-ciclododecano-tetraacético (DOTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

40 Los anticuerpos de la presente invención también pueden acoplarse a un compuesto quimioluminiscente. Ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

45 Asimismo, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes útiles para propósitos de marcaje de anticuerpos son luciferina, luciferasa y aecurina.

50 La detección de los anticuerpos marcados se puede conseguir mediante un contador de centelleo, por ejemplo, si el marcador detectable es un emisor gamma radiactivo, o mediante un fluorómetro, por ejemplo, si el marcador es un material fluorescente. En el caso de un marcador enzimático, la detección puede conseguirse por procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato para la enzima. La detección también puede conseguirse por comparación visual del grado de la reacción enzimática de un sustrato con patrones preparados de manera similar.

55 Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse como tinte de secciones tisulares. Por ejemplo, puede ponerse en contacto un anticuerpo marcado que se une a PLVAP con una muestra tisular, por ejemplo, una biopsia tisular o aspirado con aguja fina de hígado de un paciente. Esta sección después se puede lavar y detectarse su marcador usando un medio apropiado.

Con el propósito de tratar el HCC, los anticuerpos contra PLVAP de la invención pueden incluir un radiomarcador u otro agente terapéutico que potencie la destrucción de células que expresan PLVAP (por ejemplo, células endoteliales vasculares que rodean células HCC). Ejemplos de marcadores radioisotópicos adecuados para uso en terapia contra HCC incluyen, aunque sin limitación, ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Bi , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{111}In y ^{118}Re .

5 Opcionalmente, puede usarse un marcador que emita partículas α y β tras bombardeo con radiación de neutrones, tales como boro, como marcador para anticuerpos terapéuticos contra PLVAP.

Los anticuerpos terapéuticos también pueden incluir un agente citotóxico que sea capaz de eliminar selectivamente células que expresan PLVAP. Por ejemplo, pueden usarse toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, o ricina. Se muestran procedimientos para producir anticuerpos que comprenden el fragmento A de la toxina diftérica en la patente de Estados Unidos N° 4.675.382 (1987). La toxina diftérica contiene dos cadenas polipeptídicas. La cadena B de la toxina se une a un receptor sobre una superficie celular. La cadena A en realidad entra en el citoplasma e inhibe la síntesis de proteínas inactivando el factor de elongación 2, el factor que transloca los ribosomas a lo largo del ARNm de forma concomitante con hidrólisis de ETP. Véase Darnell, J. y col., en *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc., página 662 (1986). Alternativamente, puede prepararse un anticuerpo que comprende ricina, una lectina tóxica. Otros agentes citotóxicos adecuados son conocidos para los especialistas en la técnica.

10 Para detección *in vivo*, los anticuerpos contra PLVAP de la invención pueden conjugarse con radionúclidos directamente o usando un grupo funcional intermediario. Un grupo intermediario que se usa a menudo para unir radioisótopos, que existen como cationes metálicos, a anticuerpos es el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido tetraazaciclododecano-tetraacético (DOTA). Ejemplos típicos de cationes metálicos que se unen de esta manera son ^{99}Tc , ^{123}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga .

20 Además, los anticuerpos de la invención pueden marcarse con un agente de formación de imágenes de RMN, que incluye átomos paramagnéticos. El uso de un agente de formación de imágenes de RMN permite que el diagnóstico *in vivo* de la presencia de y el grado de HCC en un paciente usando técnicas de RMN. Elementos que son particularmente útiles de esta manera son ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr , y ^{56}Fe .

25 Kits de diagnóstico

La invención también proporciona kits de diagnóstico para detectar la presencia de un carcinoma hepatocelular en un sujeto.

30 Los kits de la invención incluyen un anticuerpo que se une específicamente a una proteína PLVAP (por ejemplo, una proteína PLVAP humana). Dichos anticuerpos incluyen cualquiera de los anticuerpos contra PLVAP de la invención descritos en el presente documento. En una realización, el anticuerpo comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9. En otra realización, el anticuerpo comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 14 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 19.

35 Los agentes de diagnóstico en los kits de la invención pueden incluir uno o más marcadores (por ejemplo, marcadores detectables). Se conocen en la técnica numerosos marcadores adecuados para agentes de diagnóstico e incluyen, aunque sin limitación, cualquiera de los marcadores descritos en el presente documento. En una realización particular, el agente de diagnóstico (por ejemplo, anticuerpo) incluye un radioisótopo, de modo que el agente puede usarse para la tomografía por emisión de inmuno-positrones (inmuno-PET).

40 La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos, que no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Ejemplificación

Ejemplo 1: La expresión de PLVAP está elevada en tejidos hepáticos HCC respecto a tejidos hepáticos no HCC

Materiales y procedimientos:

45 *Muestras tisulares*

Se recogieron tejidos de hígado HCC y no tumoral adyacente de muestras frescas retiradas quirúrgicamente de pacientes humanos con fines terapéuticos. Estas muestras se recogieron bajo la supervisión directa de patólogos asistentes. Los tejidos recogidos se almacenan inmediatamente en nitrógeno líquido en el Banco de Tumores del Koo Foundation Sun Yat-Sen Cancer Center (KF-SYSCC). Estuvieron disponibles muestras tisulares emparejadas de dieciocho pacientes con HCC para el estudio. El estudio se aprobó por la Junta de Revisión Institucional y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes. Las características clínicas de los dieciocho pacientes con HCC de este estudio se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Datos clínicos para dieciocho pacientes con HCC de los que se obtuvieron muestras emparejadas de tejido hepático HCC y no tumorales adyacentes

Caso nº	Sexo	Edad	HBsAg	HBsAb	IgG VHC	Fase TNM	AFP (ng/ml)	Diferenciación
1	M	70	+	-	-	2	2	Moderada
2	M	75	-	+	+	4A	5	Buena
3	M	59	+	-	-	4A	1232	Moderada
4	F	53	+	-	+	1	261	Moderada
5	M	45	+	-	-	2	103	Moderada
6	M	57	+	+	-	2	5	Moderada
7	M	53	+	+	-	3A	19647	Moderada
8	M	54	-	-	+	3A	7	Moderada
9	M	44	+	-	-	4A	306	Moderada
10	M	76	-	-	+	3A	371	Moderada
11	F	62	+	-	-	3A	302	Moderada
12	F	73	-	-	+	2	42	Moderada
13	M	46	+	-	-	4A	563	Moderada
14	M	45	-	-	-	3A	64435	Moderada
15	M	41	+	-	-	2	33,9	Buena
16	M	44	+	+	-	2	350	Moderada
17	M	67	+	-	-	3A	51073	Moderada
18	M	34	+	-	-	4A	2331	Moderada

Perfilado de transcrito de ARNm

- Se aisló el ARN total de tejidos congelados en nitrógeno líquido usando reactivos Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ARN aislado se purificó adicionalmente usando el kit RNAeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA), y su calidad se evaluó usando el ensayo RNA 6000 Nano en un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Todas las muestras de ARN usadas para el estudio tenían un número de integridad del ARN (RIN) mayor de 5,7 ($8,2 \pm 1,0$, media \pm DT). Las dianas de hibridación se prepararon a partir de 8 μ g de ARN total de acuerdo con protocolos de Affymetrix y se hibridaron a un Affymetrix U133A GeneChip, que contiene 22.238 conjuntos de sondas para aproximadamente 13.000 genes humanos. Inmediatamente después de la hibridación, la serie hibridada experimentó lavado y tinción automatizado usando una estación de fluidos Affymetrix GeneChip 400 y el protocolo EukGE WS2v4. Después de ello, los U133A GeneChip se escanearon en un escáner Affymetrix GeneArray 2500.

Determinación de designaciones presentes y ausentes de datos de microseries

- Se usó el software Affymetrix Microarray Analysis Suite (MAS) 5.0 para generar las designaciones presentes para los datos de las microseries para los 18 pares de tejidos hepáticos HCC y no tumorales adyacentes. Todos los parámetros para la determinación de designación presente fueron valores por defecto. Cada conjunto de sondas determinó como "presente", "ausente" o "marginal" por el MAS 5.0. Asimismo, los mismos datos de las microseries se procesaron usando el software dChip versión 2004 para determinar el estado "presente", "ausente" o "marginal" para cada conjunto de sondas en las microseries.

Identificación de conjuntos de sondas con expresión diferencial extrema

- Para la identificación de los genes con expresión diferencial extrema entre tejido hepático HCC y no tumoral adyacente, se usó el software escrito usando Lenguaje Práctico de Extracción e Informe (PERL) de acuerdo con las siguientes reglas: se definieron "genes específicos de tumor" como conjuntos de sondas que se designaron "presentes" en HCC y "ausentes" o "marginales" en el tejido hepático no tumoral adyacente tanto por MAS 5.0 como por dChip. Se definieron "genes específicos de tejido hepático no tumoral" como conjuntos de sondas designados "ausentes" o "marginales" en HCC y "presentes" en el tejido hepático no tumoral adyacente emparejado tanto por MAS 5.0 como por dChip. Se muestra un diagrama de flujo que representa el algoritmo de identificación en la FIG. 1.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

- Se usó PCR con transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) TaqMan™ para cuantificar el ARNm. Se sintetizó ADNc a partir de 8 μ g de ARN total para cada muestra usando 1500 ng de cebador oligo(dT) y 600 unidades de transcriptasa inversa SuperScript™ II de Invitrogen (Carlsbad, CA) en un volumen final de 60 μ l de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada reacción de RT-PCR, se usaron 0,5 μ l de ADNc como molde en un volumen final de 25 μ l, siguiendo las instrucciones del fabricante (ABI y Roche). Las reacciones de PCR se realizaron usando un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900HT. Las sondas y reactivos necesarios para los experimentos se obtuvieron de Applied Biosystems (ABI) (Foster City, CA). Las secuencias de cebadores y las sondas usados para RT-PCR cuantitativa en tiempo real de PLVAP son 5'-CCTGCAGGCATCCCTGTA-3' (cebador directo) (SEC ID N° 25); 5'-CGGGCCATCCCTTGGT-3' (cebador inverso) (SEC ID N° 26); y 5'-CCCCATCCAGTGGCTG-3' (sonda) (SEC ID N° 27). Se usó el gen de mantenimiento de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) como referencia endógena para la normalización. Todas las

muestras se procesaron por duplicado en la misma placa de PCR para el mismo ARNm diana y ARNm de HPRT de referencia endógena. Las cantidades relativas de ARNm diana se calcularon por el procedimiento comparativo Ct de acuerdo con las instrucciones del fabricante (boletín de usuario nº 2, sistema de detección de secuencia ABI Prism 7700). Se eligió una muestra hepática no tumoral como calibrador relativo para el cálculo.

5 Resultados:

Las intensidades de expresión génica de PLVAP en 18 pares de tejidos hepáticos HCC y no tumorales adyacentes se muestran en la FIG. 2. Las intensidades de expresión génica promedio fueron $759,8 \pm 436,5$ y $170,6 \pm 53,4$ (media \pm DT) para tejidos hepático emparejados HCC y no tumorales adyacentes, respectivamente. El valor p del ensayo t de muestras relacionadas entre los dos grupos fue de $2,8 \times 10^{-5}$. Estos resultados indican que PLVAP se expresa en tejido hepático HCC y no en el no tumoral. Esta elevada expresión de PLVAP en HCC se confirmó adicionalmente cuando 82 muestras HCC no emparejadas mostraron una intensidad de expresión promedio de $810,4 \pm 482,0$ (media \pm DT), que es esencialmente igual que el hallazgo de las 18 muestras HCC emparejadas ($p = 0,62$ por ensayo t) (FIG. 2).

Para confirmar que PLVAP se expresa significativamente en tejido hepático HCC y no en tejido hepático no tumoral, se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real sobre muestras de ARN de 18 pares de tejido hepático HCC y no tumoral adyacente. Las cantidades de ARNm de PLVAP fueron significativamente mayores en tejidos hepáticos HCC respecto a los no tumorales (véase la FIG. 3A y la Tabla 2). Aunque los resultados mostraron cierta superposición entre dos grupos, las transcripciones de PLVAP fueron mayores en tejido hepático HCC que en el no tumoral adyacente en el mismo individuo para todos los individuos ensayados excepto uno (FIG. 3B). Esta excepción estaba probablemente asociada con grados desiguales de degradación del ARN durante el proceso de almacenamiento de los tejidos.

Tabla 2: intensidades de expresión génica de PLVAP para 18 pares de tejido hepático HCC y no tumoral adyacente.

Número de Muestra	Intensidad de expresión*	
	HCC	Tejido hepático no tumoral adyacente
1	1757	195
2	1329	210
3	1148	168
4	1130	211
5	1096	213
6	1068	181
7	932	101
8	804	60
9	630	155
10	612	175
11	607	125
12	519	146
13	478	300
14	422	180
15	275	105
16	251	204
17	251	155
18	186	184

Ejemplo 2: PLVAP se expresa específicamente por células endoteliales vasculares de HCC

Materiales y procedimientos:

25 *Microdissección de captura por láser (LCM) de tejidos incrustados en parafina fijados en formalina*

Se realizó LCM de tejido fijado en formalina de bloques de parafina usando el sistema Arcturus PixCell^R Ile, capuchones CapSure[™] de HS LCM, y sistema reactivo Paradise[™] de Arcturus Bioscience, Inc. (Mountain View, CA). Se cortaron secciones de tejido de siete micrómetros de espesor, se deparafinizaron, se rehidrataron, se tiñeron y deshidrataron para LCM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se capturaron células diana en capuchones CapSure[™] de HS LCM usando un tamaño de mancha de $7,5 \mu\text{m}$ a 50 mW de potencia y 1,3 ms de duración. Se capturaron de aproximadamente 5000 a 6000 células en cada capuchón. Sin embargo, solamente se capturaron 1000 a 2000 células endoteliales vasculares de carcinoma hepatocelular en cada capuchón debido a la escasez de células.

Extracción de ARN de secciones de tejido LCM para RT-PCR cuantitativa

35 Las células capturadas en los capuchones CapSure[™] de HS LCM como se ha descrito anteriormente se procesaron para la extracción de ARN[™], síntesis de ADNc, transcripción *in vitro* y amplificación de ARN antisentido usando el sistema reactivo Paradise[™] de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN anti-sentido sintetizado se usó

entonces como molde para RT-PCR cuantitativa en tiempo real TaqMan de dos etapas para la cuantificación de ARNm de PLVAP y beta-actina en las células capturadas por LCM. La primera etapa (es decir, transcripción inversa) se realizó usando 4,5 µl de ARN anti-sentido y reactivos de transcripción inversa TaqMan (ABI) en un volumen final de 10 µl siguiendo el protocolo del fabricante. La segunda etapa (es decir, PCR en tiempo real) se realizó usando 2,4 µl de molde de ADNc, los mezcla de cebadores/sonda y la mezcla maestra de PCR universal TaqMan de Applied Biosystems en un volumen final de 25 µl. La PCR en tiempo real se realizó en un Smart Cycler II (Cepheid, Inc., Sunnyvale, CA). Las reacciones se incubaron inicialmente a 50°C durante 2 minutos y después a 95°C durante 10 minutos. Después de ello, se realizaron 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación/extensión a 60°C durante 40 segundos. Las secuencias de los cebadores y las sondas se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de cebador y sonda para RT-PCR cuantitativa en tiempo real para los niveles de PLVAP y beta-actina en muestras preparadas por microdissección de captura por láser.

	gen de PLVAP	gen de beta-actina
cebador directo	5'-CCTTGAGCGTGAGTGTTCCTCA-3' (SEC ID N° 28)	5'-GTCCCCCAACTTGAGATGTATGAA G-3' (SEC ID N° 29)
cebador inverso	5'-GGCAGGGCTGGGAGTTG-3' (SEC ID N° 30)	5'-GTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAG C-3' (SEC ID N° 31)
sonda Taqman	5'-CTCCAGGGAGACCAA-3' (SEC ID N° 32)	5'-AAGGAGTGGCTCCCCTCC-3' (SEC ID N° 33)

Preparación del vector de expresión para la proteína de fusión recombinante PLVAP₅₁₋₄₄₂

Se generó el plásmido pGEM®-T Easy-PLVAP₅₁₋₄₄₂ insertando un fragmento de PCR que codificaba los restos de aminoácido 51 a 442 de PLVAP en el vector pGEM®-T Easy (Promega, Inc., Madison, WI). El fragmento de PCR se amplificó a partir de un clon de ADNc de PLVAP de OriGene (Rockville, MD) usando el conjunto de cebadores de 5'-CATATGAACGTGCACGTGAGCACAGAGTCC-3' (SEC ID N° 34) y 5'-GGATCCTGAGCATATCCCTGCATCCTCC-3' (SEC ID N° 35). Para la construcción del plásmido pET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂, se escindió un fragmento de ADNc que codificaba los restos de aminoácido de 51 a 442 de PLVAP con secuencias de reconocimiento NdeI y BamHI en cada extremo respectivo del pGEM®-T Easy-PLVAP₅₁₋₄₄₂ y se insertó en pET-15b (Novagen, Inc., San Diego, CA). La construcción de expresión descrita anteriormente se verificó por secuenciación de ADN.

Expresión y purificación de proteína de fusión recombinante PLVAP₅₁₋₄₄₂

Para la producción de proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ marcada con His recombinante (SEC ID N° 2) (FIG. 4), se transformó *Escherichia coli* (Rosetta-gami2(DE3)pLysS) (Novagen) incubando células competentes con ADN plasmídico pET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂ en hielo durante 5 min., seguido de incubación en un baño de agua a 42°C durante 30 segundos y luego de nuevo en hielo durante 2 min. Antes de siembra en medio selectivo, los transformantes se incubaron a 37°C con agitación a 250 rpm con medio SOC (extracto de levadura al 0,5%; triptona al 2%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM; glucosa 20 mM) durante 60 min. La expresión de proteína de fusión marcada con His en *Escherichia coli* RosettaGami2(DE3)pLysS se indujo con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM durante 16 horas a 30°C. Después de la inducción, las células bacterianas se sometieron a lisis por sonicación en tampón de equilibrado (fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7) suplementado con urea 8 M y se separó en fracciones soluble e insoluble por centrifugación a 5.600 x g durante 30 minutos. Para purificación adicional de la proteína His-PLVAP₅₁₋₄₄₂, la fracción soluble se cargó en una resina de afinidad por metales TALON® (Clontech, Inc., Palo Alto, CA), se lavó con tampón de equilibrado y se eluyó con tampón de elución (fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,2 imidazol 50 mM). La marca His de la proteína de fusión purificada se retiró por escisión con trombina (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (véase la FIG. 5). La proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ resultante se recuperó por diálisis extensiva frente a PBS. Para verificar la identidad de la proteína PLVAP recombinante, se adquirió una pequeña cantidad de antisuero de ratón contra proteína de fusión GST-PLVAP₃₃₁₋₄₃₀ del Biodesign Institute (Tempe, AZ). La proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ recombinante sin la marca His se detectó por análisis de transferencia de Western usando este anticuerpo, pero no reaccionó con anticuerpos contra la marca His. Estos resultados confirman la identidad de la proteína PLVAP recombinante.

Generación de suero de ratón anti-PLVAP humana

La proteína recombinante PLVAP₅₁₋₄₄₂ purificada en PBS se usó para inmunizar ratones Balb/cByJ de 6 semanas de edad. Cada ratón se inmunizó inicialmente con inyección subcutánea en múltiples sitios con un total de 14 µg de proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ en adyuvante completo de Freund (Sigma, Inc., St Louis, MO). Después de ello, la inmunización se reforzó con 7 µg de proteína recombinante PLVAP₅₁₋₄₄₂ en adyuvante incompleto de Freund una vez cada dos semanas para tres veces. Una semana después de la última inmunización re fuerza, los ratones se exanguinaron para la preparación de antisuero.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Reactivos y Soluciones:

1. Proteína PLVAP recombinante
2. Conjugado IgG anti-ratón-fosfatasa alcalina (Cat. nº: AP124A, CHEMICON)
- 5 3. Tampón de recubrimiento (cloruro sódico 0,137 M, fosfato sódico dibásico heptahidratado 0,01 M, fosfato de potasio monobásico 2 mM, azida sódica al 0,002% (0,3 mM), pH 7,2-7,4)
4. Tampón de lavado (cloruro sódico 0,137 M, fosfato sódico dibásico heptahidratado 0,01 M, fosfato de potasio monobásico 2 mM, Tween 20 al 0,2% (Cat. P1379, SIGMA, pH 7,2-7,4)
- 10 5. Tampón de bloqueo (cloruro sódico 0,137 M, fosfato sódico dibásico heptahidratado 0,01 M, fosfato de potasio monobásico 2 mM, albúmina de suero bovino al 2% (Cat. 82-045, PENTEX), Tween 20 al 0,05% (Cat. P1379, Sigma), pH 7,2-7,4)
6. Tampón carbonato (bicarbonato sódico 0,016 M, carbonato sódico 0,014 M, cloruro de magnesio 2 mM, azida sódica al 0,002% (0,3 mM), pH 9,6)
- 15 7. Sustrato de fosfatasa alcalina: Se disolvió un comprimido de 40 mg de sustrato de fosfatasa (Cat. P5994, Sigma) disuelto en 40 ml de tampón carbonato

Procedimiento:

Los títulos de anticuerpos en los sueros anti-PLVAP se determinaron usando ELISA. En primer lugar, la placa ELISA de 96 pocillos se recubrió con 50 µl de proteína PLVAP disuelta en solución salino tamponada con fosfato (PBS) que contenía azida sódica al 0,002% (es decir, tampón de recubrimiento) a una concentración en el intervalo de 2,5 µg/ml durante una noche a 4°C. Después de tres lavados con 200 µl de tampón de lavado (PBS que contenía Tween-20 al 0,05%), cada pocillo de la placa recubierta se bloqueó con 150 µl de tampón de bloqueo (es decir, tampón de lavado que contenía albúmina de suero bovino al 2%) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de tres lavados adicionales, cada pocillo se incubó con 50 µl de antisuero diluido (dilución en serie de factor dos a partir de 1.000x a 128.000x) preparado en el tampón de dilución durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de ello, cada pocillo se incubó con conjugado IgG anti-ratón-fosfatasa alcalina a una dilución 5.000x (Chemico, Inc., Temecula, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados, los anticuerpos unidos se cuantificaron con 100 µl de sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma, Inc., St Louis, MO) y se realizó la medición de absorbancia se realizó a 405 nm después de un período de incubación de 25 a 40 min. usando un lector de placas ELISA.

30 *Detección inmunohistoquímica (IHC) de PLVAP en tejidos fijados en formalina*

Se cortaron secciones de seis micrómetros de bloques de parafina de tejidos fijados con formalina. Las secciones se montaron montadas en portaobjetos de vidrio de adhesión SuperFrost plus (Menzel Glaser GmbH, Braunschweig, Alemania). Las secciones después se procesaron para inmunotinción de PLVAP en un instrumento de tinción automatizado Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) usando el protocolo XT-iView-DAB-V.1 con acondicionamiento con CCI suave durante 30 minutos y las secciones se incubaron con suero anti-PLVAP humano diluido 400X a 37°C durante 36 minutos. El segundo anticuerpo y los reactivos usados para detectar la unión de anticuerpos de ratón anti-PLVAP humana fueron del kit de detección de DAB iView™ de Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ). Todos los reactivos y tampones se adquirieron de Ventana Medical Systems.

Resultados:

40 Para determinar la fuente celular de PLVAP en muestras HCC, se diseccionaron células endoteliales vasculares HCC, células tumorales de carcinoma hepatocelular y hepatocitos no tumorales, incluyendo células de revestimiento endoteliales sinusoidales, de las muestras usando microdissección de captura por láser (LCM). Debido a la estrecha aposición entre las células de hepatoma y las células endoteliales de revestimiento capilar, se hizo un esfuerzo por evitar la inclusión de células endoteliales de revestimiento capilar durante la disección. Los ARN extraídos de las células diseccionadas se usaron para RT-PCR cuantitativa en tiempo real de dos etapas para determinar las cantidades relativas de ARNm de PLVAP. Se estudiaron muestras de dos pacientes diferentes. Los resultados mostrados en la Tabla 4 y las FIG. 6A-C indican que PLVAP se expresa por células endoteliales vasculares HCC (FIG. 6A), mientras que no se detectó ningún transcrito de PLVAP detectable en tejidos hepáticos no tumorales adyacentes (FIG. 6B).

50 Tabla 4: Determinación de cantidades relativas de ARNm de PLVAP en dos muestras de HCC por RT-PCR cuantitativa en tiempo real Taqman en células diseccionadas por microdissección de captura por láser

Muestra HCC	Cantidad relativa de ARNm de PLVAP		
	Células endoteliales HCC	Tejido hepático no tumoral adyacente	Células tumorales HCC
A	1	0	0,002
B	1	0,001	0,057

Para investigar adicionalmente la especificidad de tejido y enfermedad de la expresión de PLVAP, se generaron anticuerpos policlonales para su uso en estudios de inmunohistoquímica (IHC) contra el dominio extracelular de PLVAP humana (aminoácidos 51 a 442). Como se muestra en la FIG. 7, el antisuero obtenido de ratones Balb/c que se habían inmunizado con proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ recombinante contenía un alto título de anticuerpos anti-PLVAP.

- 5 Después se usó el antisuero anti-PLVAP para determinar la localización de la expresión de PLVAP en secciones tisulares de pacientes con carcinoma hepatocelular (n = 7) (FIG. 8A-F y 9A-D), hiperplasia nodular focal (n = 4) (FIG. 10A-F), hemangioma hepático (n = 2) (FIG. 11A y B), hepatitis B activa crónica (n = 2) (FIG. 12A y B) o C (n = 4) (FIG. 13A-D), y cáncer metastásico (n = 4) (es decir, colangiocarcinoma intrahepático, adenocarcinoma colorrectal metastásico o carcinoma de ovario metastásico) (FIG. 14A-D). Los resultados mostraron que sólo las células endoteliales capilares de carcinomas hepatocelulares expresaban proteína PLVAP (FIG. 8A, C, E y 9A, C, E, F). La proteína PLVAP no se expresaba en células endoteliales que revisten los sinusoides/capilares vasculares de tejidos hepáticos no tumorales, incluyendo hígado cirrótico, hígado de hiperplasia nodular focal (FIG. 10A-F), y hepatitis crónica (FIG. 12A y B; FIG. 13A-D). Las células de revestimiento endotelial de hemangioma hepático no mostraron expresión significativa de PLVAP, tampoco (FIG. 11A y B). Estos resultados demuestran que PLVAP es un biomarcador endotelial vascular que es específico para carcinoma hepatocelular, pero no para otras enfermedades del hígado. Por lo tanto, PLVAP puede usarse como marcador de diagnóstico y diana terapéutica para HCC.

Ejemplo 3: Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen específicamente a PLVAP

Materiales y procedimientos

20 *Procedimientos de inmunización*

Se inmunizaron cinco ratones Balb/cByJ hembra de seis semanas de edad inicialmente con 20 µg de proteína PLVAP recombinante purificada disuelta en 0,125 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y emulsionada en un volumen igual de adyuvante completo de Freund. La mezcla de PLVAP-adyuvante se inyectó en volúmenes de 0,05 ml en cada uno de cuatro sitios subcutáneos diferentes en el lado ventral de los ratones cerca de los vasos linfáticos axilares e inguinales, así como un quinto sitio subcutáneo, que estaba localizado entre las escápulas. Todos los ratones recibieron una inmunización de refuerzo de 20 µg de proteína PLVAP recombinante inyectada por vía intraperitoneal tres veces cada dos semanas. Una semana después de la última inmunización de refuerzo, se tomaron sangrados de ensayo para medir si los ratones estaban produciendo títulos suficientemente altos de anticuerpos anti-PLVAP (> 10.000X). Se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida para este propósito. El ratón que produjo el mayor título de anticuerpo contra PLVAP se seleccionó para la producción de hibridomas.

Desarrollo de anticuerpos anti-PLVAP monoclonales murinos

Tres días antes del experimento de fusión programado para producir hibridomas, el ratón que produjo el mayor título de anticuerpo contra PLVAP se inyectó por vía intravenosa con 20 µg de PLVAP recombinante. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales (MAb) contra PLVAP se produjeron de acuerdo con un protocolo previamente descrito (véase Unidad 2.5 Production of Monoclonal Antibodies, en Current Protocols in Immunology, editores: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, y Strober W. Publicado por John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001) con pequeñas modificaciones. Específicamente, se fusionaron células esplénicas recogidas del ratón inmunizado con células de mieloma SP2/0 en una proporción de 7,5:1 (células esplénicas:células de mieloma) usando polietilenglicol 1540 al 50%. Los productos de fusión se sembraron en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos, y se añadió medio selectivo de hipoxantina-aminopterintimidina (HAT) al día siguiente. De siete a diez días después, los sobrenadantes de pocillos de crecimiento positivo se seleccionaron para la producción de anticuerpos anti-PLVAP por ELISA. Los hibridomas que producían inicialmente MAb anti-PLVAP se expandieron y re-seleccionaron. Los hibridomas que mostraron producción continuada de anticuerpos se clonaron por el procedimiento de dilución limitante. Los isotipos de MAb se determinaron usando un ELISA. Los anticuerpos monoclonales se purificaron del líquido ascítico o medios de cultivo de cromatografía en columna de afinidad por proteína G (Unidad 2.7 Purification and Fragmentation of Antibodies, en Current Protocols in Immunology, editores: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, y Strober W. Publicado por John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001).

50 *Ensayo ELISA*

Los ensayos ELISA se realizaron como se describe en el presente documento (véase el Ejemplo 2).

Determinación de afinidades de unión

Se midieron las afinidades de unión de anticuerpos monoclonales anti-PLVAP KFCC-GY4 y KFCC-GY5 en ANT Technology Co., Ltd. (Taipei, Taiwán), usando tecnología de microbalanza de cristal de cuarzo ANQ300 (Lin S., y col. J Immunol Methods 239: 121-124 (2000)).

Aislamiento y cultivo de células del endotelial vascular umbilical humano (HUVEC)

El aislamiento y cultivo de HUVEC se realizaron de acuerdo con el protocolo establecido descrito en Baudin B, Bruneau A, Bosselut N y Vaubourdel M. *Nature Protocols* 2: 481-485 (2007). Durante el mantenimiento del cultivo de células endoteliales, se usó gelatina al 1% (DIFCO, Corp.) disuelta en solución salina tamponada con fosfato para reemplazar la solución de colágeno para placas de cultivo de recubrimiento o cubreobjetos.

Extracción de proteínas de membrana hidrófoba de HUVEC por tampón que contiene Triton X-114 (TX-114)

Se sembraron quinientas mil HUVEC en una placa de cultivo de 10 cm durante 24 horas. Las células luego se estimularon con VEGF humano en 40 ng/ml durante 72 horas adicionales. Las células cultivadas se lavaron con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces. Las células luego se desprendieron y se levantaron de la placa por incubación con 1 ml de PBS que contenía EDTA 2 mM, se colocaron en un tubo de centrifuga, y se recogieron por centrifugación a 300x g durante 5 minutos. Había aproximadamente 2 millones de células en el sedimento producido por centrifugación. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 200 µl de tampón Tris 0,05 M enfriado en hielo, que contenía EDTA 5 mM y Triton X-114 (TX-114) al 0,5% (v/v), pH 7,4. La suspensión celular solubilizada se incubó en hielo con agitación en vórtice ocasional suave. Después de ello, la suspensión celular se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos a 4°C para retirar los restos celulares insolubles. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio y se incubó a 37°C durante 5 minutos. Durante la incubación el TX-114 llegó a separarse de la fase acuosa. El tubo de microcentrifuga se centrifugó entonces a 1000x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, de manera que el TX-114 se centrifugó hasta la parte inferior del tubo. Se retiró la fase acuosa en la parte superior del tubo y el sedimento de TX-114 que contenía proteínas celulares hidrófobas se disolvió en tampón de muestra de gel de SDS acrilamida 2x en un volumen final de 50 µl. Se usaron quince µl de muestra para electroforesis en gel de SDS acrilamida.

Electroforesis en gel de SDS acrilamida, preparación de transferencia de Western e inmunotransferencia

Los procedimientos son los mismos que los descritos previamente por Kao KJ, Scornik JC y McQueen CF. *Human Immunol* 27: 285-297 (1990), con una ligera modificación. La detección de la unión de los anticuerpos en transferencias de Western se realizó usando sustrato quimioluminiscente de fosfatasa alcalina y un LAS-4000 luminiscentes Image Analyzer (Fujifilm Corp.)

Microscopía de inmunofluorescencia

Materiales:

1). Anticuerpos primarios:

- a.) IgG de ratón normal (Sigma Corp., nº de catálogo: I-5381) disuelto en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 1 mg/ml como solución madre, diluido con PBS-BSA al 0,5% hasta una concentración de 5 µg/ml antes de su uso;
- b.) anticuerpo monoclonal de ratón anti-factor de von Willebrand humano (vWF) (DakoCytomation Corp., nº de catálogo: M0616) diluido 50x con PBS que contenía BSA al 0,5% antes de su uso;
- c.) anticuerpos monoclonales anti-PLVAP KFCC-GY4 y KFCC-GY5 purificados se diluyeron hasta 5 µg/ml con PBS que contenía BSA al 0,5% antes de su uso;

2). Anticuerpo secundario: de cabra conjugado con FITC F(ab')₂ anti-IgG (H y L) de ratón (Serotec, Corp., nº de catálogo: Star105F);

3). Medio de montaje VectaShield con DAPI (*Vector Labs, Corp., nº de catálogo: H-1200*);

4). Metanol al 100% (*Merck corp nº de catálogo: 1.06009*); y

5). Solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (*Gibco, Corp., nº de catálogo: 12065-056*) diluido a 1x antes de su uso.

Procedimiento:

Para preparar células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano para el estudio de inmunofluorescencia, se colocaron cincuenta mil células en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos con un cubreobjetos redondo de 1,5 cm estéril colocado en la parte inferior de cada pocillo. Cada pocillo contenía 0,5 ml de medio de cultivo M199 que estaba suplementado con suero de ternera fetal al 20%, L-glutamina al 1%, solución de antibiótico/antimicótico al 1%, 50 µg/ml de heparina y 75 µg/ml de suplemento de crecimiento celular endotelial (Sigma, Corp. E0760). Cada cubreobjetos se pre-recubrió con 200 µl de 0,4 mg/ml de colágeno de piel de ternero (Sigma Corp. C9791) en ácido acético al 0,04% (v/v) durante una noche. Los cubreobjetos se lavaron después con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1x estéril, y posteriormente se secaron al aire para su uso. Las células se cultivaron durante una noche y luego se estimularon con 40 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) durante 72 horas adicionales. Las células sobre los cubreobjetos se usaron para el procedimiento de inmunofluorescencia.

Para teñir las células para la microscopía de inmunofluorescencia, las células cultivadas en el cubreobjetos en cada pocillo se lavaron con 0,5 ml de HBSS 1x. Las células se fijaron entonces y se permeabilizaron en 0,5 ml de metanol enfriado en hielo durante 5 minutos. Las células fijadas se lavaron 3 veces con 0,5 ml de PBS 1x durante 5 minutos por lavado. Las células fijadas después se bloquearon con 0,5 ml de PBS 1x que contenía BSA al 0,5% durante 1 hora a temperatura ambiente. El cubreobjetos que contenía las células fijadas se retiró y se colocó en la parte superior de solución de anticuerpo primario diluido a 0,2 ml, que contenían 5 µg/ml de IgG normal, anticuerpo monoclonal anti-PLVAP KFCC-GY4 o KFCC-GY5, o una dilución 50x de anticuerpo monoclonal anti-vWF humano, con las células fijadas hacia abajo y en contacto con la solución de anticuerpo. La solución de anticuerpo se colocó en un trozo de parafilm en un pequeño recipiente de plástico cubierto. La humedad interior se mantuvo colocando un pequeño trozo de papel de filtro humedecido con agua.

Después de incubación a 37°C durante una hora en un recipiente humidificado, el cubreobjetos se retiró y las células en el cubreobjetos se lavaron 3 veces con 0,5 ml de PBS durante 5 minutos cada vez. Las células fijadas después se incubaron con 0,2 ml de anticuerpo secundario de cabra F(ab')₂ conjugado con FITC anti-IgG de ratón diluido 200x durante 50 minutos a 37°C como se describe para la incubación con solución de anticuerpo primario. Después de ello, las células se lavaron 3 veces con PBS como se ha descrito anteriormente. Las células teñidas se montaron en un portaobjetos de vidrio usando solución anti-destinción VectaShield. Se retiró el exceso de medio de montaje del borde del cubreobjetos y el borde se selló con esmalte de uñas. Las células teñidas se examinaron usando un microscopio fluorescente.

Resultados

La inmunización de ratones Balb/cByJ con proteína PLVAP humana recombinante condujo al desarrollo de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales (mAb) que reconocían proteína PLVAP humana. Se seleccionaron dos hibridomas para su posterior estudio. Los anticuerpos producidos por estos hibridomas se llamaron KFCC-GY4 y KFCC-GY5. Las secuencias de los dominios V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5, y las CDR de estos dominios, se muestran en las FIG. 15A y B y 16A y B, respectivamente.

Ambos anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se unieron a proteína PLVAP recombinante en ensayos ELISA (FIG. 17) e inmunotransferencia (FIG. 18C y D).

Estos anticuerpos también reaccionaron específicamente con proteína PLVAP en extractos de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano en un ensayo de inmunotransferencia (FIG. 19B y 19D). Además, los experimentos de tinción de inmunofluorescencia mostraron unión de anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 a células endoteliales vasculares humanas que expresan PLVAP (FIG. 20C y D).

Las afinidades de unión (K_d) de los anticuerpos monoclonales para la proteína PLVAP recombinante se determinaron en 0,41 x 10⁻⁷ M para mAb KFCC-GY5 y 0,6 x 10⁻⁷ M para mAb KFCC-GY4 usando microbalanza de cristal de cuarzo ANTQ300 (Lin, y col. J. Immunol. Methods 239: 121-124, 2000).

Los experimentos de inmunohistoquímica realizados sobre secciones de hepatoma del hígado de dos pacientes de hepatoma diferentes usando anticuerpos monoclonales anti-PLVAP KFCC-GY4 o KFCC-GY5 mostraron que el anticuerpo monoclonal KFCC-GY5 produce una señal más fuerte en células endoteliales vasculares (FIG. 21A, C) que el anticuerpo monoclonal KFCC-GY4 (FIG. 21B, D).

Los experimentos de inmunohistoquímica realizados sobre secciones tisulares hepáticas de hepatoma y no tumoral adyacentes del hígado de un mismo paciente se realizaron en muestras de cuatro pacientes con hepatoma seleccionados al azar diferentes usando el anticuerpo monoclonal anti-PLVAP KFCC-GY4. La expresión de PLVAP se detectó en células endoteliales vasculares de tejidos de hepatoma (FIG. 22A, C, E, y G), pero no de tejidos hepáticos no tumorales adyacentes (FIG. 22B, D, F y H).

Ejemplo 4: La proteína PLVAP se expresa en las superficies de células endoteliales vasculares

Materiales y procedimientos

45 *Microscopía de inmunofluorescencia*

Reactivos:

Los reactivos usados para el siguiente procedimiento son como se ha descrito en el Ejemplo 3, con las siguientes modificaciones:

- el tampón de lavado HBSS 1x contenía azida sódica al 0,1%, que se usó para evitar la endocitosis de anticuerpos unidos a la superficie celular;
- los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 anti-PLVAP se diluyeron en el tampón de lavado HBSS 1x con azida sódica al 0,1%;

Procedimiento:

La tinción inmunofluorescente de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano (HUVEC) se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 3, excepto que las células no se fijaron y se permeabilizaron con metanol. En lugar de ello, después de la incubación con anticuerpos monoclonales anti-PLVAP, las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de esta incubación, las células se lavaron 3 veces, y luego se incubaron con F(ab')₂ de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Después de tres lavados adicionales, las células se procesaron para microscopía de inmunofluorescencia como se ha descrito en el Ejemplo 3.

Resultados

Usando el enfoque descrito anteriormente, solamente la proteína PLVAP expresada en la superficie celular podía detectarse. Los resultados de estos experimentos revelaron que ambos anticuerpos monoclonales anti-PLVAP KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se unían a la superficie de células endoteliales vasculares HCC (FIG. 23B, C), lo que indica que la proteína PLVAP se expresa en las superficies de estas células. Estos hallazgos sugieren que anticuerpos que se unen específicamente a PLVAP con alta afinidad podrán unirse a la superficie de células endoteliales vasculares HCC tras inyección en los vasos sanguíneos de un tumor de carcinoma hepatocelular.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> China Synthetic Rubber Corporation Kao, Kuo-Jang Huang, Andrew T.

<120> PROCEDIMIENTOS Y AGENTES PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

<130> 4261.1001002

20 <150> US 61/069.910

<151> 19-03-2008

<160> 35

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

25 <211> 1322

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia codificante para los restos de aminoácidos 51-442 de PLVAP humana recombinante marcada con His

<400> 1

```

atggggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcy cggcagccat 60
atgaacgtgc acgtgagcac agagtccaac ctgcaggcca ccgagcggcg agccgagggc 120
ctatacagtc agctcctagg gctcacggcc tcccagtcca acttgaccaa ggagctcaac 180
ttcaccaccc gcgccaagga tgccatcatg cagatgtggc tgaatgctcg ccgagacctg 240
gaccgcatca atgccagctt ccgcccagtc cagggtgacc gggtcactca cacgaacaat 300
cagaggtaca tggctgccat catcttgagt gagaagcaat gcagagatca attcaaggac 360
atgaacaaga gctgcatgct cttgctcttc atgctgaatc agaaggtgaa gacgctggag 420
gtggagatag ccaaggagaa gaccatttgc actaaggata aggaaagcgt gctgctgaaac 480
aaacgcgtgg cggaggaaaca gctgggtgaa tgcgtgaaa cccgggagct gcagcaccaa 540
gagcggcagc tggccaagga gcaactgcaa aaggtgcaag ccctctgctt gccctggac 600
aaggacaagt ttgagatgga ccttcgtaac ctgtggaggg actccattat cccacgcagc 660
ctggacaacc tgggttaca cctctaccat cccctgggct cggaatggc ctccatccgc 720
agagcctgcy accacatgcc cagcctcatg agctccaagg tggaggagct ggcccggagc 780
ctccggggcgg atatcgaacg cgtggcccgc gagaactcag acctccaacg ccagaagctg 840
gaagcccagc agggcctgcy ggccagtcag gaggcgaaac agaaggtgga gaaggaggct 900
caggcccggg aggccaagct ccaagctgaa tgctcccggc agaccagct agcgtggag 960
gagaaggcgg tgctgcygaa ggaacgagac aacctggcca aggagctgga agagaagaag 1020
agggaggcgg agcagctcag gatggagctg gccatcagaa actcagccct ggacacctgc 1080
atcaagacca agtcgcagcc gatgatgcca gtgtcaaggc ccatgggccc tgtccccaac 1140
ccccagccca tcgaccagc tagcctggag gagttcaaga ggaagatcct ggagtcccag 1200
agggcccctg caggcatccc tgtagccca tccagtggct gaggaggctc caggcctgag 1260
gaccaaggga tggcccgaact cggcggtttg cggaggatgc agggatatgc tcacagggat 1320
tc 1322
    
```

ES 2 527 072 T3

<210>2
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Restos de aminoácidos 51-442 de PLVAP humana recombinante marcada con His
 <400> 2

```

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1          5          10
Arg Gly Ser His Met Asn Val His Val Ser Thr Glu Ser Asn Leu Gln
 20          25          30
Ala Thr Glu Arg Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Ser Gln Leu Leu Gly Leu
 35          40          45
Thr Ala Ser Gln Ser Asn Leu Thr Lys Glu Leu Asn Phe Thr Thr Arg
 50          55          60
Ala Lys Asp Ala Ile Met Gln Met Trp Leu Asn Ala Arg Arg Asp Leu
 65          70          75          80
Asp Arg Ile Asn Ala Ser Phe Arg Gln Cys Gln Gly Asp Arg Val Ile
 85          90          95
Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Tyr Met Ala Ala Ile Ile Leu Ser Glu Lys
 100         105         110
Gln Cys Arg Asp Gln Phe Lys Asp Met Asn Lys Ser Cys Asp Ala Leu
 115         120         125
Leu Phe Met Leu Asn Gln Lys Val Lys Thr Leu Glu Val Glu Ile Ala
 130         135         140
Lys Glu Lys Thr Ile Cys Lys Asp Lys Glu Ser Val Leu Leu Asn Lys
 145         150         155         160
Arg Val Ala Glu Thr Glu Gln Leu Val Glu Cys Val Lys Thr Arg Glu
 165         170         175
Leu Gln His Gln Glu Arg Gln Leu Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Val
 180         185         190
Gln Ala Leu Cys Leu Pro Leu Asp Lys Asp Lys Phe Glu Met Asp Leu
 195         200         205
Arg Asn Leu Trp Arg Asp Ser Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Asn Leu
 210         215         220
Gly Tyr Asn Leu Tyr His Pro Leu Gly Ser Glu Leu Ala Ser Ile Arg
 225         230         235         240
Arg Ala Cys Asp His Met Pro Ser Leu Met Ser Ser Lys Val Glu Glu
 245         250         255
Leu Ala Arg Ser Leu Arg Ala Asp Ile Glu Arg Val Ala Arg Glu Asn
 260         265         270
Ser Asp Leu Gln Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gln Gln Gly Leu Arg Ala
 275         280         285
Ser Gln Glu Ala Lys Gln Lys Val Glu Lys Glu Ala Gln Ala Arg Glu
 290         295         300
Ala Lys Leu Gln Ala Glu Cys Ser Arg Gln Thr Gln Leu Ala Leu Glu
 305         310         315         320
Glu Lys Ala Val Leu Arg Lys Glu Arg Asp Asn Leu Ala Lys Glu Leu
 325         330         335
Glu Glu Lys Lys Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Met Glu Leu Ala Ile
 340         345         350

Arg Asn Ser Ala Leu Asp Thr Cys Ile Lys Thr Lys Ser Gln Pro Met
 355         360         365
Met Pro Val Ser Arg Pro Met Gly Pro Val Pro Asn Pro Gln Pro Ile
 370         375         380
Asp Pro Ala Ser Leu Glu Phe Lys Arg Lys Ile Leu Glu Ser Gln
 385         390         395         400
Arg Pro Pro Ala Gly Ile Pro Val Ala Pro Ser Ser Gly
 405         410
    
```

10 <210>3
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 527 072 T3

<220>

<223> Secuencia codificante del dominio KFCC-GY4 VH

<400> 3

```

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag tttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gactactata tacactgggt gaagcagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg agaatggtga tattgaatat 180
gccccgaagt tccagggcaa ggcactatg actgcagaca catcctccaa tacagcctac 240
ctgcagttca gcagcctgac atctgaggac actgcogtct attactgtct ctaccaagaa 300
ggctcctggg gcccaaggcac cactctcaca gtctcctcag cc 342
    
```

5

<210>4

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio KFCC-GY4 VH

<400> 4

```

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

<210>5

<211>5

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR1

<400> 5

```

Asp Tyr Tyr Ile His
 1          5
    
```

20

<210>6

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia CDR2

25

<400> 6

```

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ile Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1          5          10          15
Gly
    
```

<210>7

<211>4

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

ES 2 527 072 T3

<220>
 <223> Secuencia CDR3
 <400>7

Gln Glu Gly Ser
 1

5 <210>8
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante del dominio KFCC-GY4 VL
 <400> 8

```
gatgttgga tgaccagac tccactcact ttgtcggta ccattggaca accagcctcc 60
atctcttga agtcaagtca gagcctctta aatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
ttgttacaga ggcaggcca gtctccaaag cgcctaactc atctggtgtc taaattggac 180
tctggagtc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggta acattttccg 300
ttcacgttcg gaggggggac caagctgga ataaaa 336
```

15 <210>9
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio KFCC-GY4 VL
 <400> 9

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

20 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia CDR1
 <400> 10

```
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1          5          10          15
```

30 <210> 11
 <211>7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR2

<400> 11

5

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 12

<211>9

<212> PRT

<213> Secuencia CDR3

10

<400> 12

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 13

<211> 342

<212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante del dominio KFCC-GY-5-VH

<400> 13

```

caggccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agcaactaca taaactgggt gaaacagagg 120
cctggacagg gccttgagtg gatcggaat atttatecct ctgatgggtt tactaactac 180
aatcaaaagt tcaaggacag ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagaaacttc 300
gatgtctggg gcgcagggac cacggtcacc gtctcctcag cc 342
    
```

20

<210> 14

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> KFCC-GY5 VH domain

<400> 14

```

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

<210> 15

<211>5

<212> PRT

<213> Secuencia CDR1

30

ES 2 527 072 T3

<400> 15

Ser Asn Tyr Ile Asn
1 5

5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR2

<400> 16

10

Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 17
<211>4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Secuencia CDR3

<400> 17
Asn Phe Asp Val

1

20

<210> 18
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Secuencia codificante del dominio KFCC-GY5 VL

<400> 18

```
gatgtgtgga tgacccaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgcg gatctagtca gagccttgtc cacagtaatg gaaacaccta tttacagtgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctctgatct acacagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagggc cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
ttcacgttcg gctcggggac aaagtggaa ataaaa 336
```

30

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio KFCC-GY5 VL

<400> 19

ES 2 527 072 T3

```

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

```

- <210> 20
- <211> 16
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia CDR1
- <400> 20

```

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
 1           5           10           15

```

- 10 <210>21
- <211>7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Secuencia CDR2
- <400> 21

```

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1           5

```

- 20 <210> 22
- <211>9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia CDR3
- <400> 22

```

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr
 1           5

```

- 25 <210> 23
- <211> 442
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 30 <400> 23

Met Gly Leu Ala Met Glu His Gly Gly Ser Tyr Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Arg Gly Cys Trp Tyr Tyr Leu Arg Tyr Phe Phe Leu Phe Val
 20 25 30
 Ser Leu Ile Gln Phe Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Phe Met Val
 35 40 45
 Tyr Gly Asn Val His Val Ser Thr Glu Ser Asn Leu Gln Ala Thr Glu
 50 55 60
 Arg Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Ser Gln Leu Leu Gly Leu Thr Ala Ser
 65 70 75 80
 Gln Ser Asn Leu Thr Lys Glu Leu Asn Phe Thr Thr Arg Ala Lys Asp
 85 90 95
 Ala Ile Met Gln Met Trp Leu Asn Ala Arg Arg Asp Leu Asp Arg Ile
 100 105 110
 Asn Ala Ser Phe Arg Gln Cys Gln Gly Asp Arg Val Ile Tyr Thr Asn
 115 120 125
 Asn Gln Arg Tyr Met Ala Ala Ile Ile Leu Ser Glu Lys Gln Cys Arg
 130 135 140
 Asp Gln Phe Lys Asp Met Asn Lys Ser Cys Asp Ala Leu Leu Phe Met
 145 150 155 160
 Leu Asn Gln Lys Val Lys Thr Leu Glu Val Glu Ile Ala Lys Glu Lys
 165 170 175
 Thr Ile Cys Thr Lys Asp Lys Glu Ser Val Leu Leu Asn Lys Arg Val
 180 185 190
 Ala Glu Glu Gln Leu Val Glu Cys Val Lys Thr Arg Glu Leu Gln His
 195 200 205
 Gln Glu Arg Gln Leu Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Val Gln Ala Leu
 210 215 220
 Cys Leu Pro Leu Asp Lys Asp Lys Phe Glu Met Asp Leu Arg Asn Leu
 225 230 235 240
 Trp Arg Asp Ser Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Asn Leu Gly Tyr Asn
 245 250 255
 Leu Tyr His Pro Leu Gly Ser Glu Leu Ala Ser Ile Arg Arg Ala Cys
 260 265 270
 Asp His Met Pro Ser Leu Met Ser Ser Lys Val Glu Glu Leu Ala Arg
 275 280 285
 Ser Leu Arg Ala Asp Ile Glu Arg Val Ala Arg Glu Asn Ser Asp Leu
 290 295 300
 Gln Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gln Gln Gly Leu Arg Ala Ser Gln Glu
 305 310 315 320
 Ala Lys Gln Lys Val Glu Lys Glu Ala Gln Ala Arg Glu Ala Lys Leu
 325 330 335
 Gln Ala Glu Cys Ser Arg Gln Thr Gln Leu Ala Leu Glu Glu Lys Ala
 340 345 350
 Val Leu Arg Lys Glu Arg Asp Asn Leu Ala Lys Glu Leu Glu Glu Lys
 355 360 365
 Lys Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Met Glu Leu Ala Ile Arg Asn Ser
 370 375 380
 Ala Leu Asp Thr Cys Ile Lys Thr Lys Ser Gln Pro Met Met Pro Val
 385 390 395 400
 Ser Arg Pro Met Gly Pro Val Pro Asn Pro Gln Pro Ile Asp Pro Ala
 405 410 415
 Ser Leu Glu Glu Phe Lys Arg Lys Ile Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
 420 425 430
 Ala Gly Ile Pro Val Ala Pro Ser Ser Gly
 435 440

<210> 24
 <211> 2317
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

ES 2 527 072 T3

```

cggacgcgtg ggtgagcagg gacggtgcac cggacggcgg gatcgagcaa atgggtctgg 60
ccatggagca cggaggggtcc tacgctcggg cggggggcag ctctcggggc tgctgggtatt 120
acctgcgcta cttcttcctc ttcgctcccc tcatccaatt cctcatcatc ctggggctcg 180
tgctcttcat ggtctatggc aacgtgcacg tgagcacaga gtccaacctg caggccaccg 240
agcgcgagc cgagggccta tacagtcagc tcctagggct cacggcctec cagtccaact 300
tgaccaagga gctcaacttc accaccgcg ccaaggatgc catcatgcag atgtggctga 360
atgctcgccg cgacctggac cgcataaatg ccaagctccg ccagtgcag ggtgaccggg 420
tcatctacac gaacaatcag aggtacatgg ctgccatcat cttgagttag aagcaatgca 480
gagatcaatt caaggacatg aacaagagct gcgatgcctt gctcttcatg ctgaatcaga 540
aggtgaagac gctggagggtg gagatagcca aggagaagac cattedgact aaggataagg 600
aaagcgtgct gctgaaacaaa cgcgtggcgg aggaacagct ggttgaatgc gtgaaaacc 660
gggagctgca gcaccaagag cgcagctgg ccaaggagca actgcaaaag gtgcaagccc 720
tctgcctgcc cctggacaag gacaagttag agatggacct tcgtaacctg tggagggact 780
ccattatccc acgcagcctg gacaacctgg gttacaacct ctaccatccc ctgggctcgg 840
aattggcttc catccgcaga gcctgcgacc acatgccag cctcatgagc tccaaggtgg 900
aggagctggc ccggagcctc cgggcggata tcgaacgcgt ggcccgcgag aactcagacc 960
tccaacgcca gaagctggaa gccagcagg gcctgcgggc cagttaggag gcgaaacaga 1020
aggtggagaa ggaggctcag gcccgggagg ccaagctcca agctgaatgc tcccggcaga 1080
cccagctagc gctggaggag aaggcgggtg tgccgaagga acgagacaac ctggccaagg 1140
agctggaaga gaagaagagg gaggcggagc agctcaggat ggagctggcc atcagaaact 1200
cagccctgga cacctgcatc aagaccaagt cgcagccgat gatgccagtg tcaaggcca 1260
tgggcccctgt ccccaacccc cagcccctcg accagctag cctggaggag tcaagagga 1320
agatcctgga gtcccagagg ccccctgcag gcatccctgt agcccctcc agtggctgag 1380
gaggctccag gcctgaggac caaggatgg cccgactcgg cggtttggg aggatgcagg 1440
gatatgctca cagcgcgccg cacaaccccc tcccgcgcc cccaaccacc cagggccacc 1500
atcagacaac tccctgcatg caaaccccta gtaccctctc acaccgcac ccgcccctca 1560
cgatccctca cccagagcac acggcgcgg agatgacgtc acgcaagcaa cggcgtgac 1620
gtcacatatic accgtggtga tggcgtcacg tggccatgta gacgtcacga agagatatag 1680
cgatggcgtc gtgcagatgc agcacgtcgc acacagacat ggggaactg gcatgacgtc 1740
acaccgagat gcagcaacga cgtcacgggc catgtcgacg tcacacatat taatgtcaca 1800
cagacgcggc gatggcatca cacagacggg gatgatgtca cacacagaca cagtgacaac 1860

acacaccatg acaacgacac ctatagatat ggcaccaaca tcacatgcac gcatgccctt 1920
tcacacacac tttctaccca attctcacct agtgtcacgt tccccgacc ctggcacacg 1980
ggccaaggta cccacaggat cccatcccct ccgcacagc cctgggcccc agcacctccc 2040
ctcctccagc ttcctggcct cccagccact tcctcacccc cagtgcctgg acccggagg 2100
gagaacagga agccattcac ctccgctcct tgagcgtgag tgtttccagg accccctcgg 2160
ggcctgagc cgggggtgag ggtcacctgt tgtcgggagg ggagccactc cttctcccc 2220
aactcccagc cctgcctgtg gcccgttgaa atgttgggtg cacttaataa atattagtaa 2280
atccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2317

```

<210> 25

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótidos

<400> 25

cctgcaggca tcctgta 18

10

<210> 26

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> cebador de oligonucleótidos

<400> 26

cgggcatcc cttggt 16

20

<210> 27

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sonda de oligonucleótidos

 <400> 27
 ccccatccag tggctg 16
 5 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos
 10 <400> 28
 ccttgagcgt gagtgttcc a 21

 <210> 29
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos
 20 <400> 29
 gtccccaac ttgagatga tgaag 25

 <210> 30
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos

 <400> 30
 ggcagggctg ggagttg 17
 30 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos
 35 <400> 31
 gtctcaagtc agtgtacagg taagc 25

 <210> 32
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos

 <400> 32
 ctcccaggga gaccaa 16
 45 <210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 50

<400> 33
aaggagtggc tcccctcc 18

5 <210> 34
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótidos

10 <400> 34
catatgaacg tgcacgtgag cacagagtcc 30

<210> 35
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 35
ggatcctgag catatccctg catcctcc 28

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la SEC ID N° 23 con una K_d de 10^{-7} M o menor medida usando una microbalanza de cristal de cuarzo ANTQ300, para su uso en un procedimiento in vivo para detectar carcinoma hepatocelular (HCC) en un sujeto, que comprende administrar el anticuerpo por inyección intra-arterial o inyección intravenosa, en el que el anticuerpo comprende un radioisótopo, obtener una imagen del hígado de un sujeto y detectar la acumulación del anticuerpo en el hígado de un sujeto en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende
- 5
- a) un dominio variable de anticuerpo que comprende una CDR1 que consiste en la SEC ID N° 5, una CDR2 que consiste en la SEC ID N° 6, y una CDR3 que consiste en la SEC ID N° 7; y un dominio variable de anticuerpo que comprende una CDR1 que consiste en la SEC ID N° 10, una CDR2 que consiste en la SEC ID N° 11, y una CDR3 que consiste en la SEC ID N° 12; o
- 10
- b) un dominio variable de anticuerpo que comprende una CDR1 que consiste en la SEC ID N° 15, una CDR2 que consiste en la SEC ID N° 16, y una CDR3 que consiste en la SEC ID N° 17 y un dominio variable de anticuerpo que comprende una CDR1 que consiste en la SEC ID N° 20, una CDR2 que consiste en la SEC ID N° 21, y una CDR3 que consiste en la SEC ID N° 22.
- 15
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en la reivindicación 1 (a), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en la reivindicación 1 (a), o reivindicación 2, en el que el anticuerpo comprende un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.
- 20
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en la reivindicación 1 (b), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 14.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en la reivindicación 1 (b), o reivindicación 4, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 19.
- 25
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano.
- 30
7. Un procedimiento de diagnóstico de un carcinoma hepatocelular en un sujeto, que comprende detectar el nivel de proteína PLVAP en una muestra del sujeto y determinar que el nivel de la proteína PLVAP en la muestra está aumentado respecto a un control, en el que el nivel de proteína PLVAP en una muestra del sujeto se detecta usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende
- a) un dominio variable de anticuerpo que comprende una CDR1 que consiste en la SEC ID N° 5, una CDR2 que consiste en la SEC ID N° 6, y una CDR3 que consiste en la SEC ID N° 7; y un dominio variable de anticuerpo que comprende una CDR1 que consiste en la SEC ID N° 10, una CDR2 que consiste en la SEC ID N° 11, y una CDR3 que consiste en la SEC ID N° 12; o
- 35
- b) un dominio variable de anticuerpo que comprende una CDR1 que consiste en la SEC ID N° 15, una CDR2 que consiste en la SEC ID N° 16, y una CDR3 que consiste en la SEC ID N° 17 y un dominio variable de anticuerpo que comprende una CDR1 que consiste en la SEC ID N° 20, una CDR2 que consiste en la SEC ID N° 21, y una CDR3 que consiste en la SEC ID N° 22.
- 40
8. El procedimiento de la reivindicación 7 (a), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.
9. El procedimiento de la reivindicación 7 (a), o reivindicación 8, en el que el anticuerpo comprende un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.
- 45
10. El procedimiento de la reivindicación 7 (b), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 14.
11. El procedimiento de la reivindicación 7 (b), o reivindicación 10, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 19.
- 50
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado con un isótopo radiactivo.

Algoritmo de identificación de genes de expresión diferencial extrema

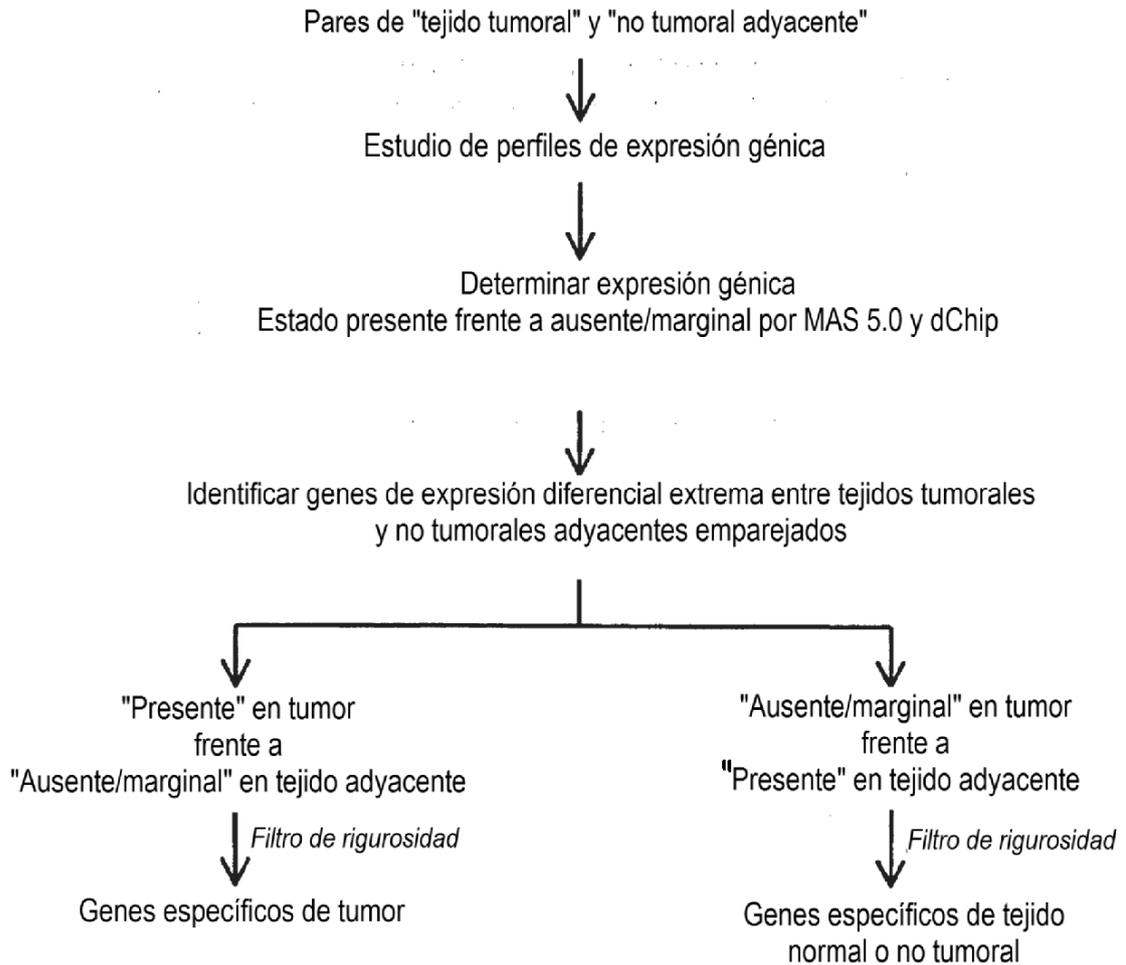


FIG. 1

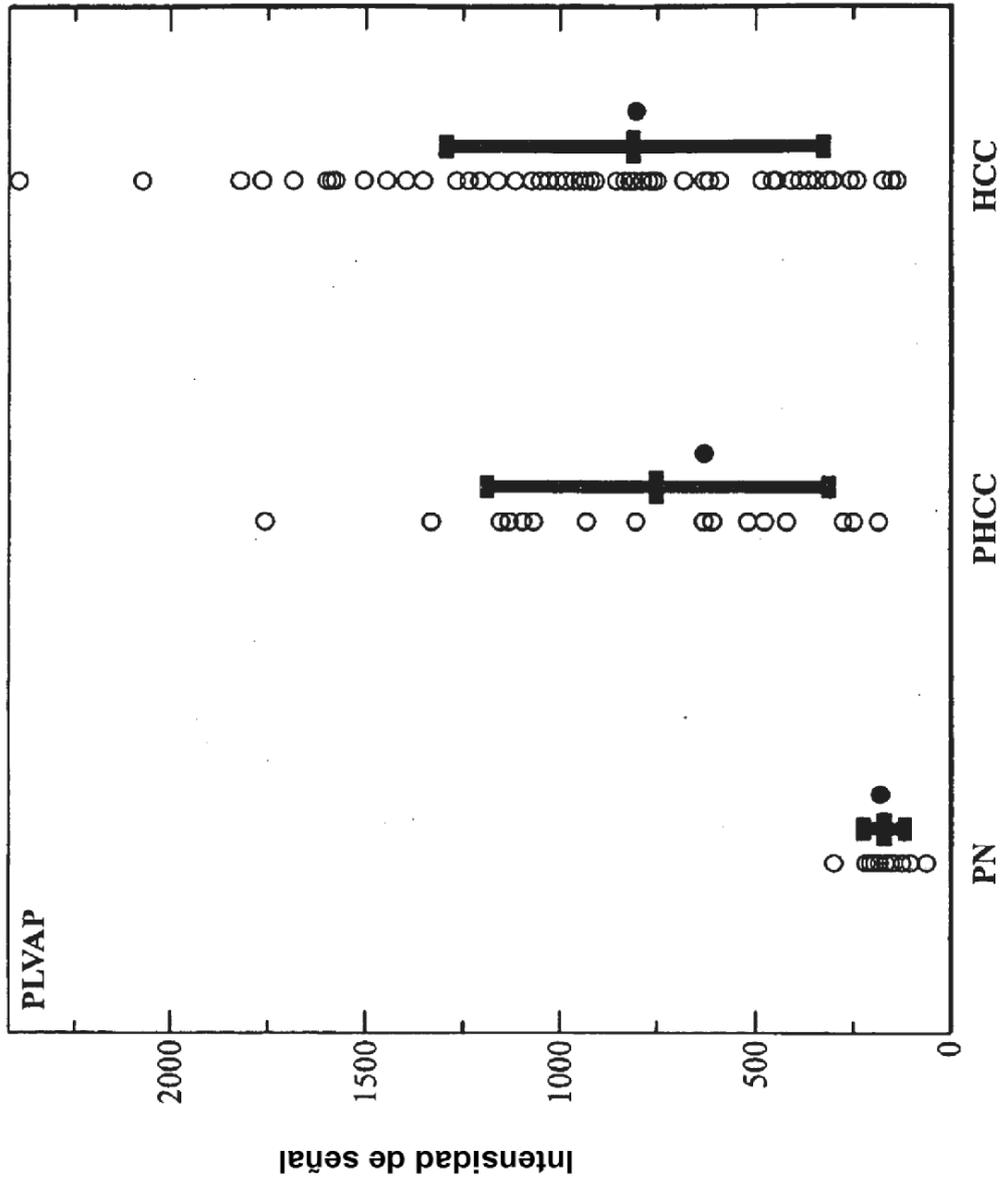


FIG. 2

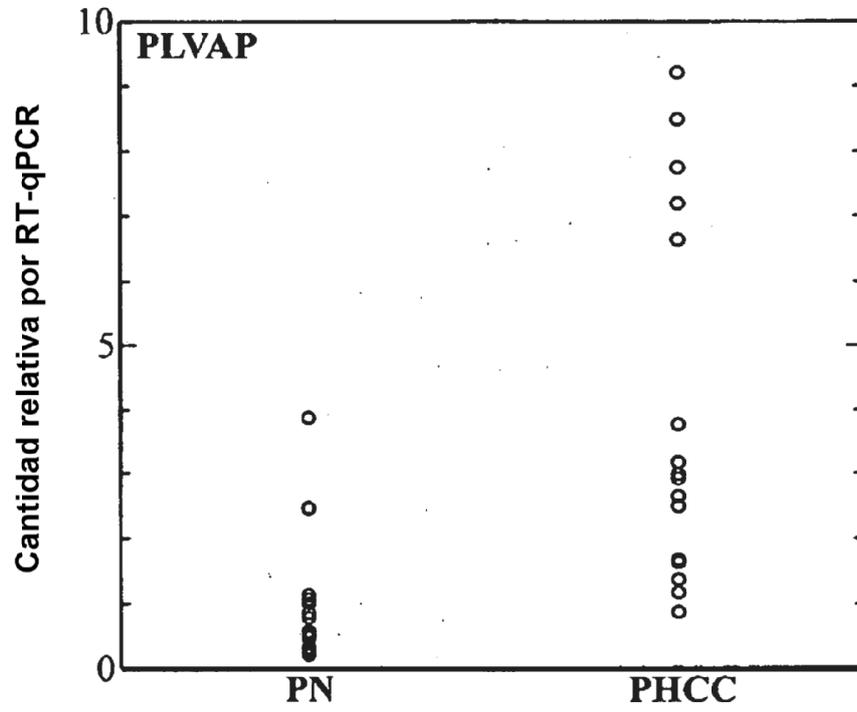
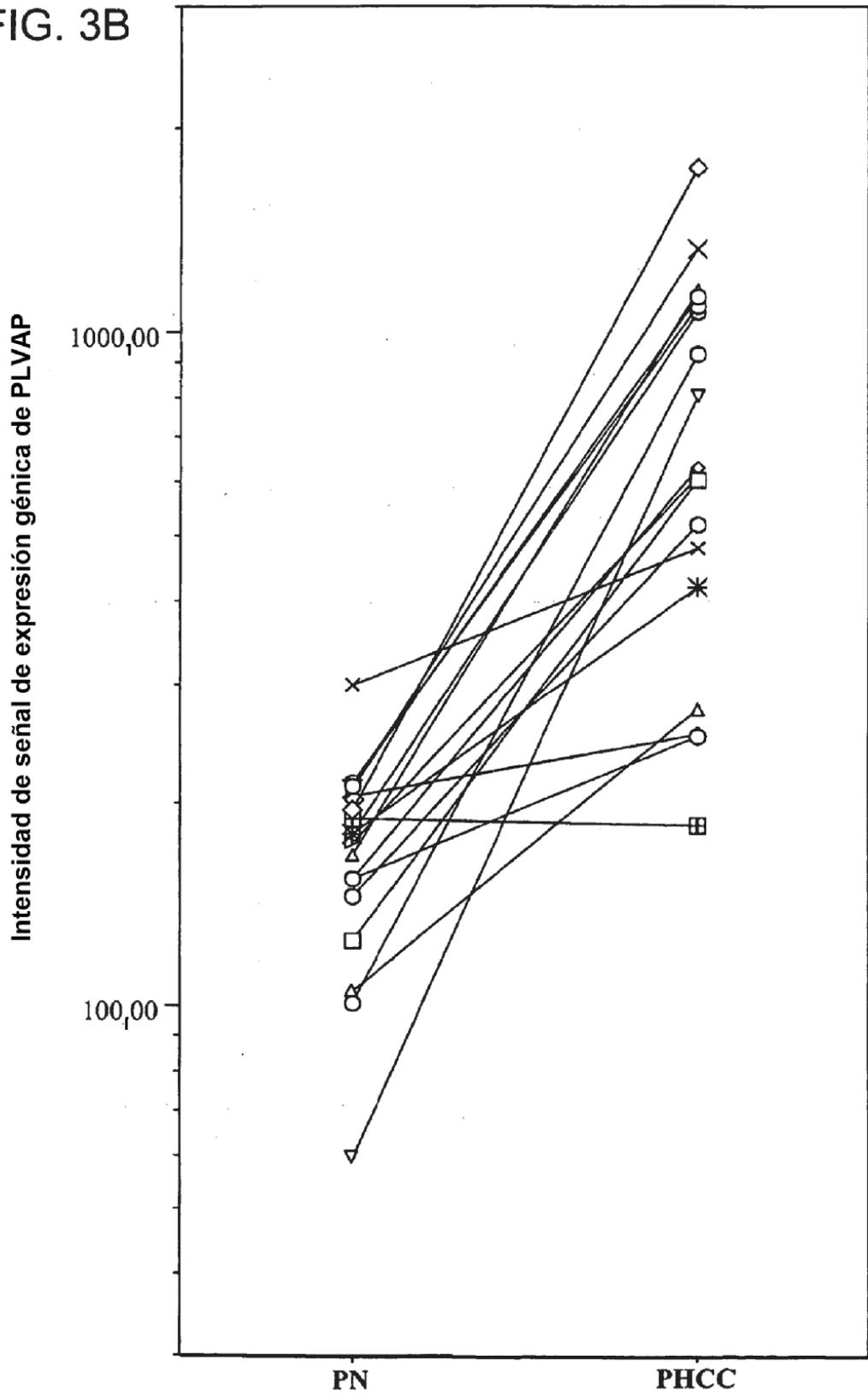


FIG. 3A

FIG. 3B



1 atgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctggtg
 M G S S H H H H H S S G L V
 46 ccgcgcggcagccatataaacgtgcacgtgagcacagagtccaac
 P R G S H M N V H V S T E S N
 91 ctgcaggccaccgagcgcggagccgagggcctatacagtcagctc
 L Q A T E R R A E G L Y S Q L
 136 ctagggtcacggcctcccagtccaacttgaccaaggagctcaac
 L G L T A S Q S N L T K E L N
 181 ttcaccaccgcgccaaggatgccatcatgcagatgtggctgaat
 F T T R A K D A I M Q M W L N
 226 gctcgcgcgacctggaccgcatcaatgccagcttccgccagtg
 A R R D L D R I N A S F R Q C
 271 cagggtgaccgggtcatctacacgaacaatcagaggtacatggct
 Q G D R V I Y T N N Q R Y M A
 316 gccatcatcttgagtgagaagcaatgcagagatcaattcaaggac
 A I I L S E K Q C R D Q F K D
 361 atgaacaagagctgcgatgccttgctcttcatgctgaatcagaag
 M N K S C D A L L F M L N Q K
 406 gtgaagacgctggaggtggagatagccaaggagaagaccatttgc
 V K T L E V E I A K E K T I C
 451 actaaggataaggaaagcgtgctgctgaacaaacgcgtggcggag
 T K D K E S V L L N K R V A E
 496 gaacagctgggtgaatgcgtgaaaaccgggagctgcagcaccaa
 E Q L V E C V K T R E L Q H Q
 541 gagcgcagctggccaaggagcaactgcaaaagggtgcaagccctc
 E R Q L A K E Q L Q K V Q A L
 586 tgccctgccctggacaaggacaagtgtgagatggaccttcgtaac
 C L P L D K D K F E M D L R N
 631 ctgtggagggactccattatcccacgcagcctggacaacctgggt
 L W R D S I I P R S L D N L G
 676 tacaacctctaccatcccctgggctcggaattggcctccatccgc
 Y N L Y H P L G S E L A S I R
 721 agagcctgcgaccacatgcccagcctcatgagctccaagggtggag
 R A C D H M P S L M S S K V E
 766 gagctggcccggagcctccgggcgatatacgaacgcgtggcccgc
 E L A R S L R A D I E R V A R
 811 gagaactcagacctccaacgccagaagctggaagcccagcagggc
 E N S D L Q R Q K L E A Q Q G
 856 ctgcgggcccagtcaggaggcgaacagaaggtggagaaggaggct
 L R A S Q E A K Q K V E K E A
 901 caggcccgggaggccaagctccaagctgaatgctcccggcagacc
 Q A R E A K L Q A E C S R Q T
 946 cagctagcgtggaggagaaggcgggtgctgcggaaggaacgagac
 Q L A L E E K A V L R K E R D

FIG. 4A

991 aacctggccaaggagctggaagagaagaagagggaggcggagcag
N L A K E L E E K K R E A E Q
1036 ctcaggatggagctggccatcagaaactcagccctggacacctgc
L R M E L A I R N S A L D T C
1081 atcaagaccaagtgcgagccgatgatgccagtgtcaaggcccatg
I K T K S Q P M M P V S R P M
1126 ggcctgtccccaacccccagcccatcgaccagctagcctggag
G P V P N P Q P I D P A S L E
1171 gagttcaagaggaagatcctggagtcccagagggccccctgcaggc
E F K R K I L E S Q R P P A G
1216 atccctgtagcccatccagtggctga
I P V A P S S G * (SEC ID N° 2)
ggaggctccaggcctgaggaccaagggatggcccgactcggcggt

ttgcgaggatgcagggatatgctcacagggattc (SEC ID N° 1)

FIG. 4B

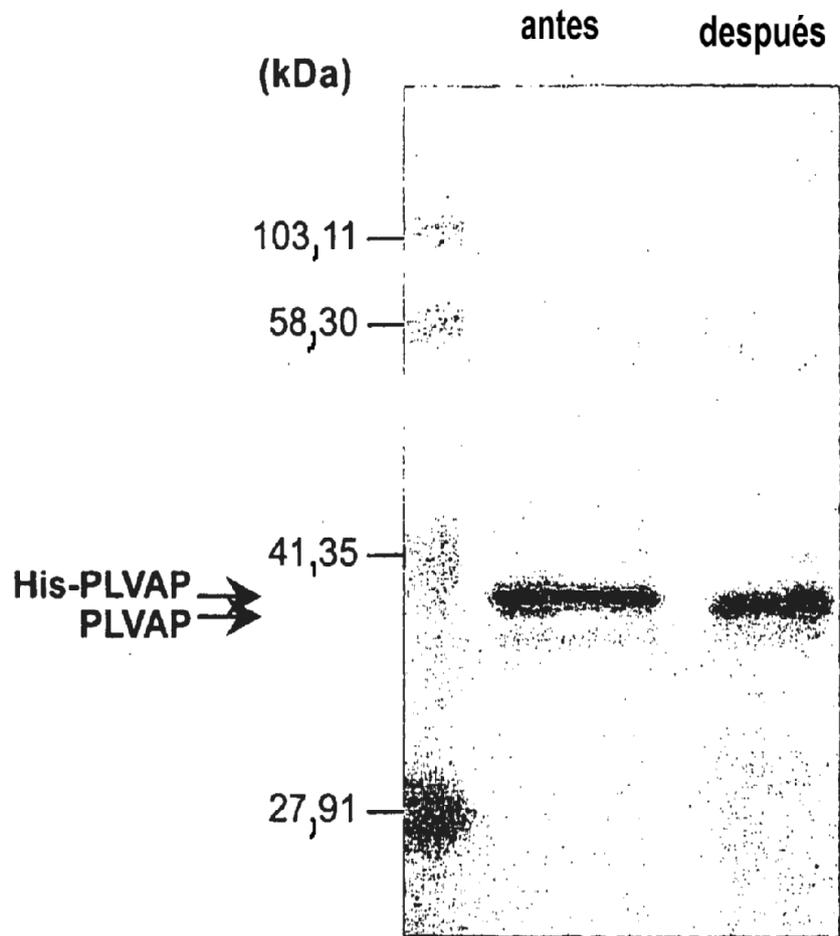


FIG. 5

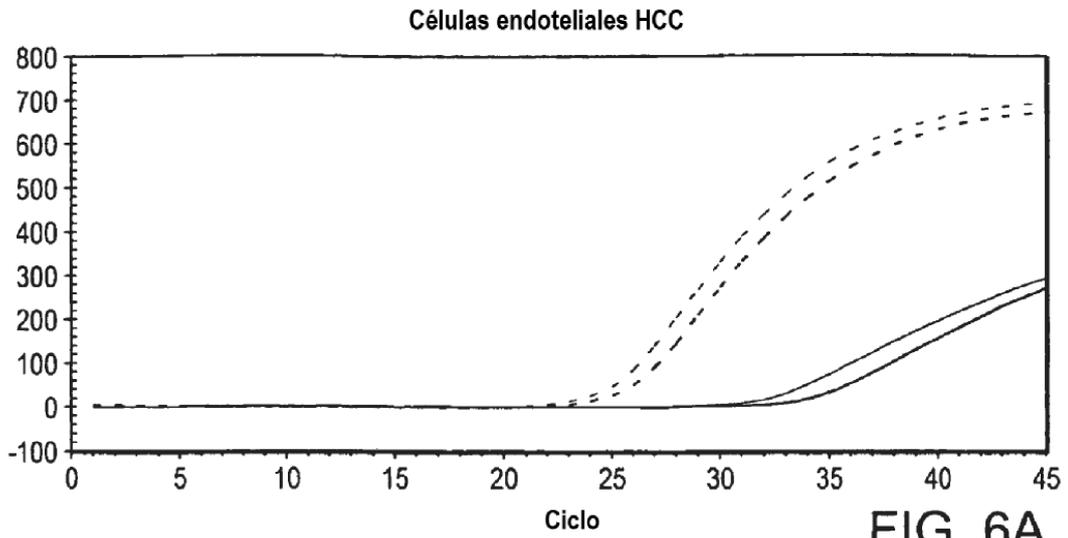


FIG. 6A

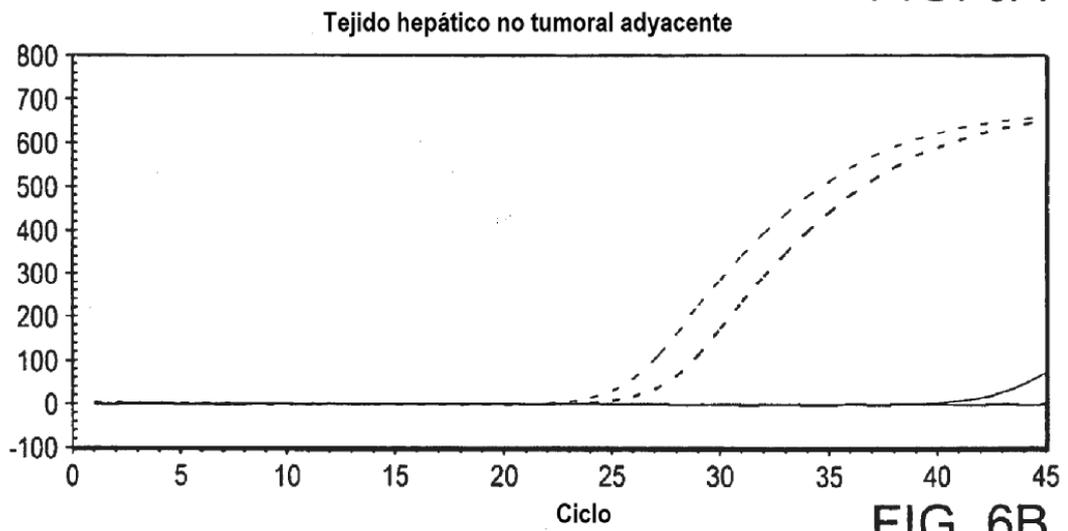


FIG. 6B

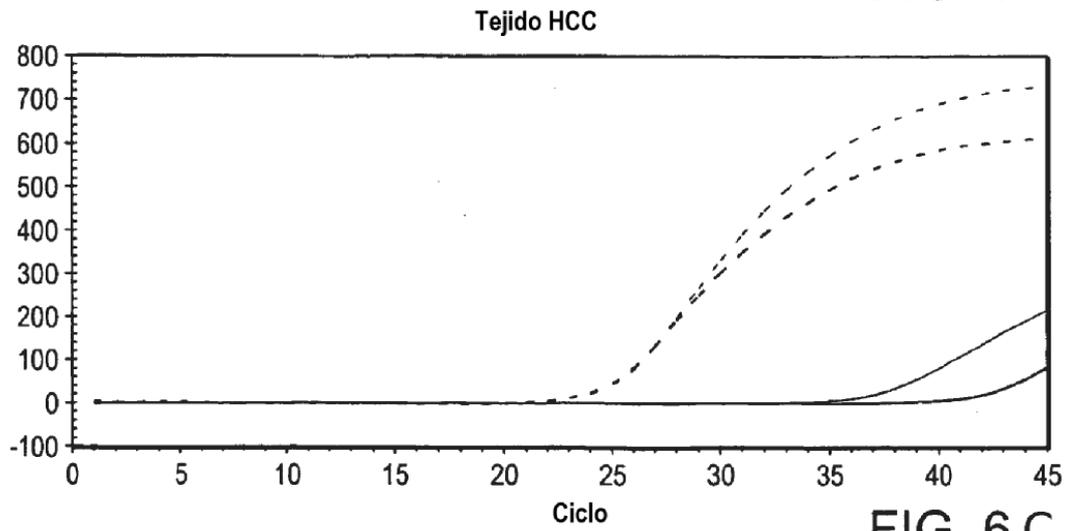


FIG. 6C

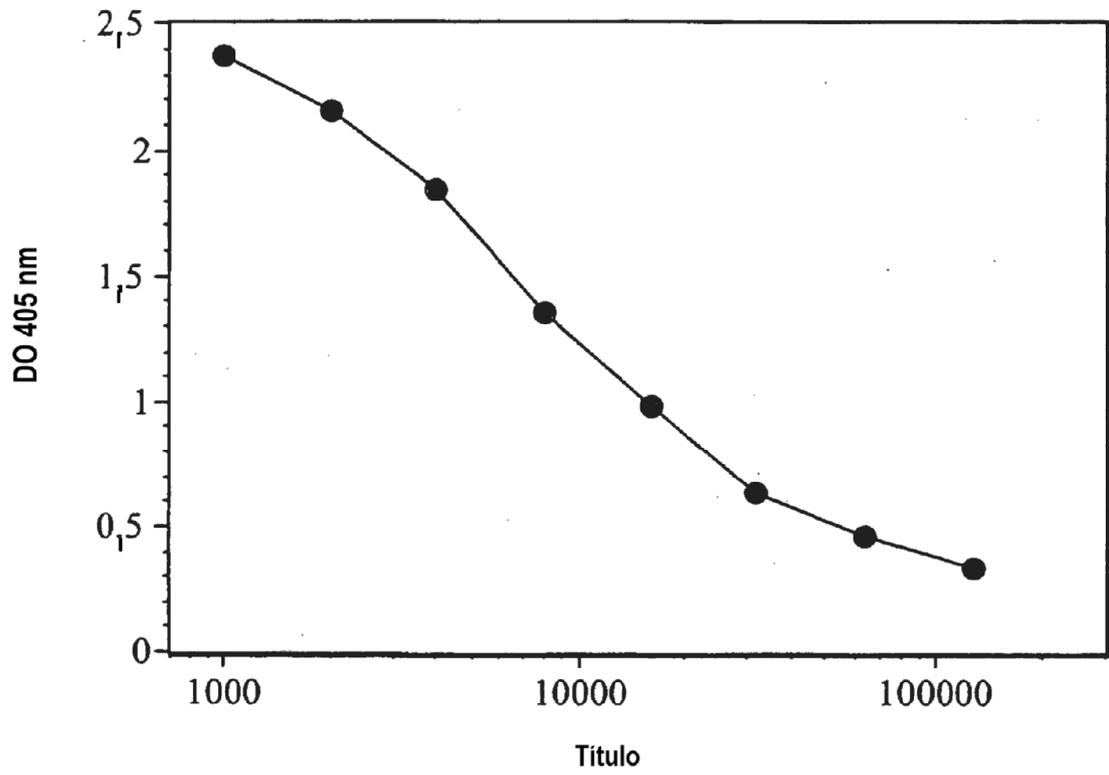


FIG. 7

FIG. 8B

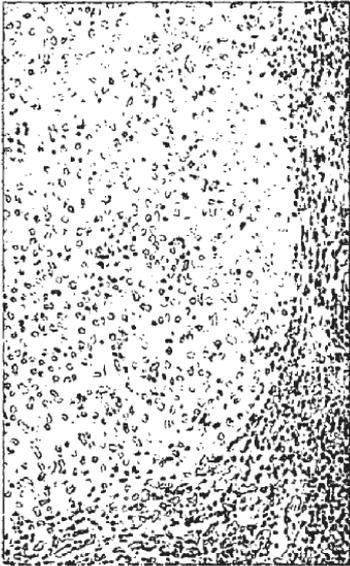


FIG. 8D

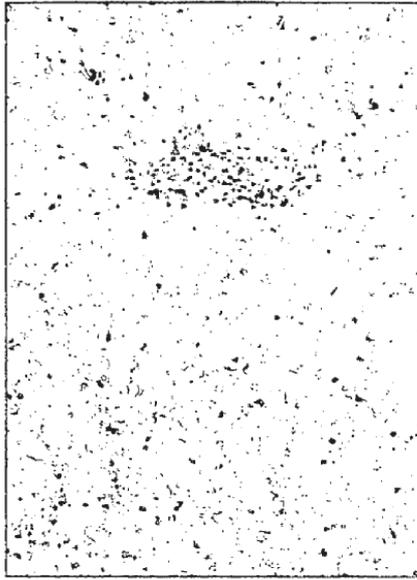


FIG. 8F



FIG. 8A

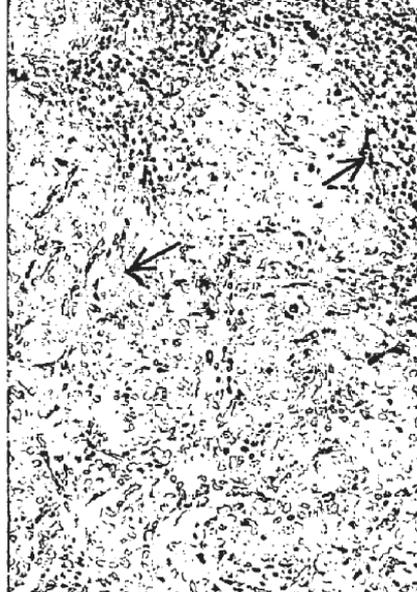


FIG. 8C



FIG. 8E

FIG. 9A



FIG. 9B

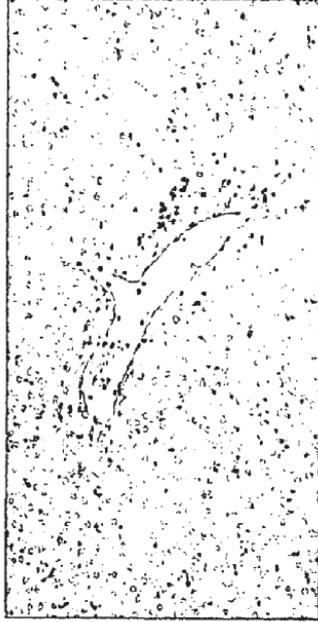


FIG. 9C



FIG. 9D

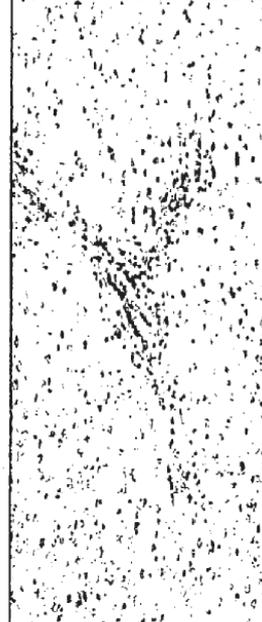


FIG. 9E

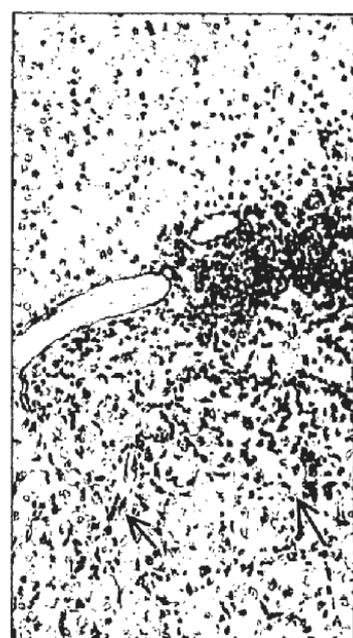


FIG. 9F



Tejido HCC en la línea discontinua

Tejido no tumoral adyacente fuera de la línea discontinua

FIG. 10C

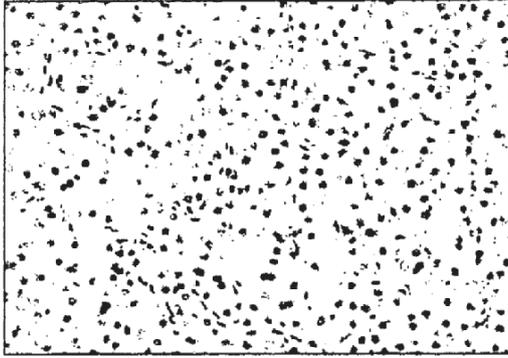


FIG. 10B

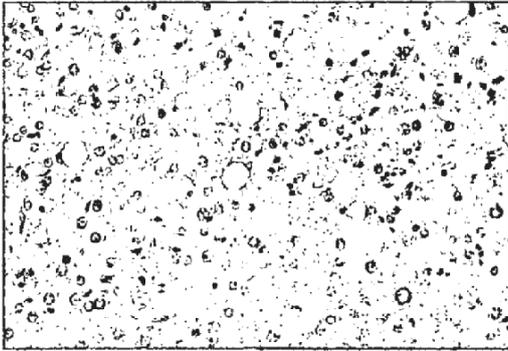


FIG. 10A

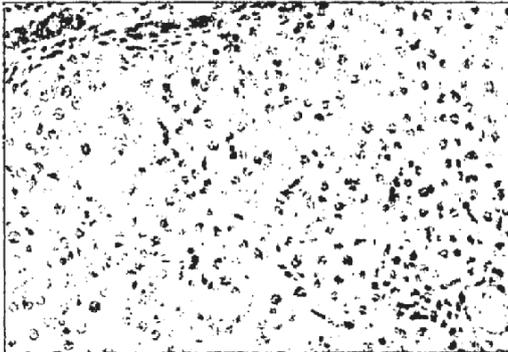


FIG. 10F

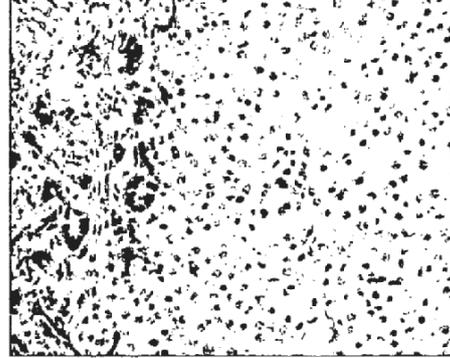


FIG. 10E

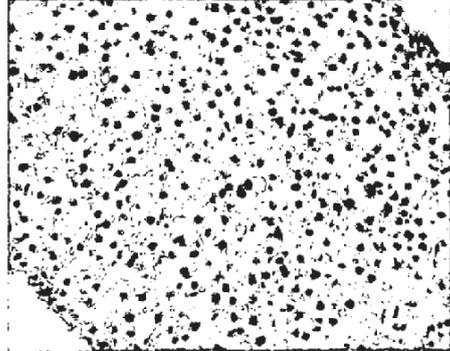


FIG. 10D

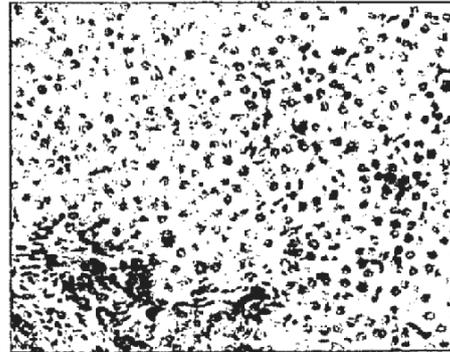




FIG. 11B

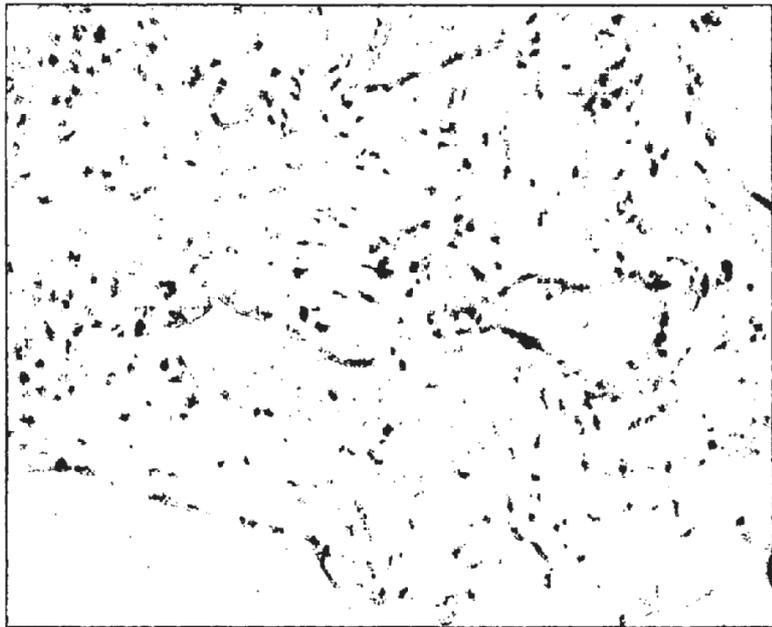


FIG. 11A

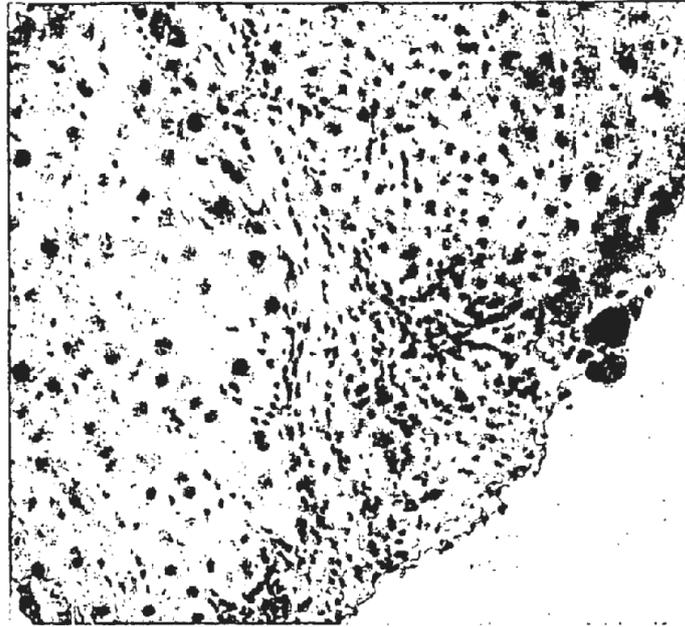


FIG. 12B

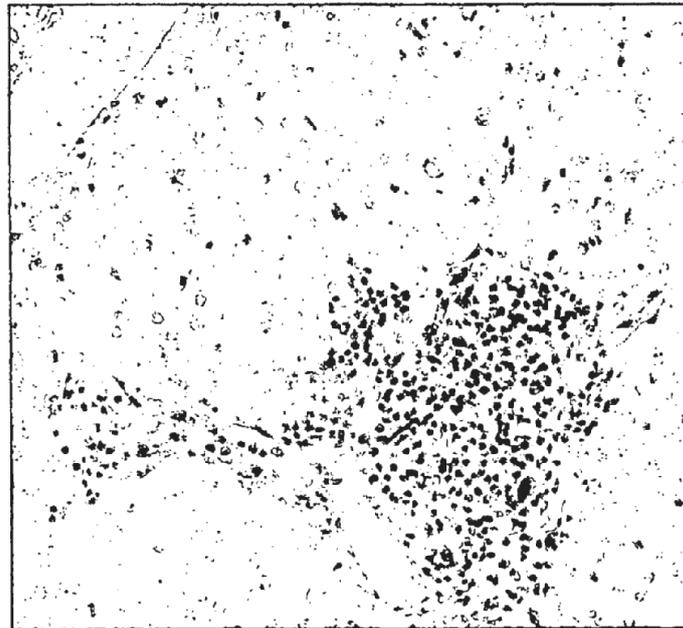


FIG. 12A



FIG. 13A

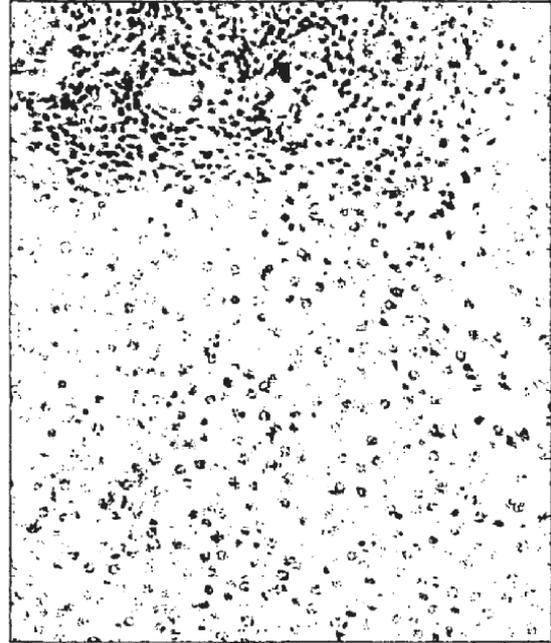


FIG. 13B



FIG. 13C

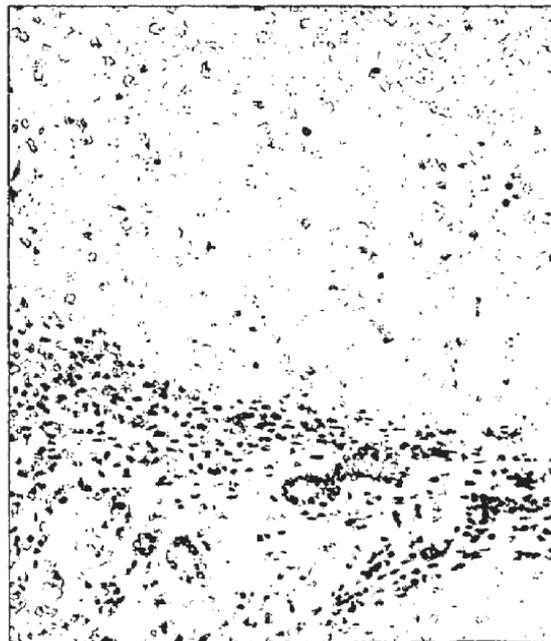


FIG. 13D

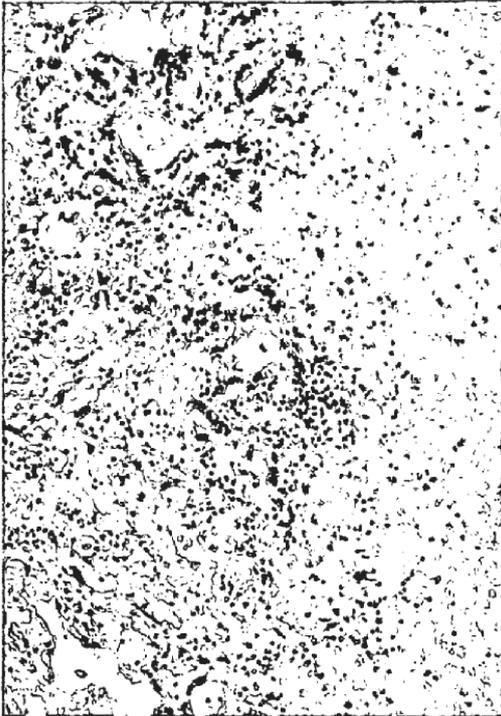


FIG. 14B

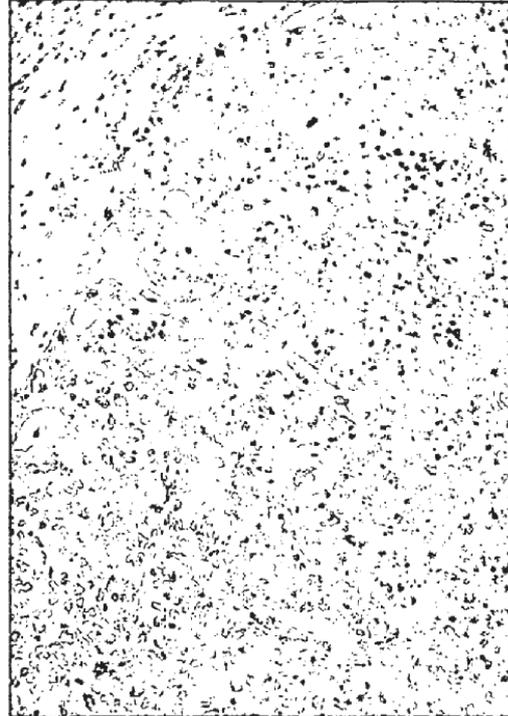


FIG. 14D



FIG. 14A

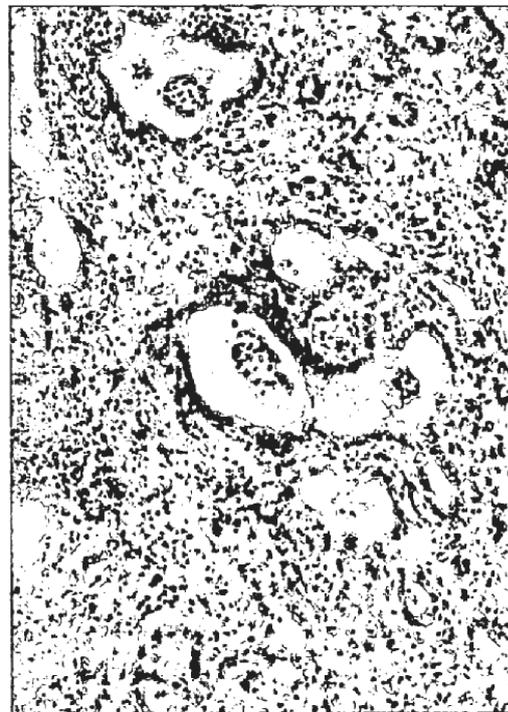


FIG. 14C

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGTTTGTGAGGTGAGGGCCTCAGTCAAGTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAA 90
 GACTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGAA CAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAAATGGTGAATTTGAAATAT 180
 GCCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCAATACAGCCTACCTGCAGTTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGAC 270
 ACTGCCGTCTATTACTGTCTCTACCAAGAAGGCTCCTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCC 342 (SEC ID N° 3)

E V Q L Q Q S G A E F V R S G A S V K L S C T A S G F N I K
D Y Y I H W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D I E Y

CDR1

CDR2

A P K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y L Q F S S L T S E D
 T A V Y Y C L Y Q E G S W G Q G T T L T V S S A (SEC ID N° 4)

CDR3

- CDR1: D Y Y I H (SEC ID N° 5)
- CDR2: W I D P E N G D I E Y A P K F Q G (SEC ID N° 6)
- CDR3: Q E G S (SEC ID N° 7)

FIG. 15A

GATGTTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTA 90
 AATAGTGATGGAAGACATATTTGAATTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATGGAC 180
 TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTT 270
 TATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTCCGTTCCAGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAAATAAAA 336 (SEC ID N° 8)

D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L
N S D G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D

CDR1

S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V
Y Y C W Q G T H F P F T F G G T K L E I K (SEC ID N° 9)

CDR3

CDR1: K S S Q S L L N S D G K T Y L N (SEC ID N° 10)

CDR2: L V S K L D S (SEC ID N° 11)

CDR3: W Q G T H F P F T (SEC ID N° 12)

CDR2

FIG. 15B

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACC 90
 AGCAACTACATAAACTGGGTGAAAACAGAGGCCCTGGACAGGGCCCTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATGGTTTTACTAACTAC 180
 AATCAAAAAGTTCAAGGACAGGGCCACATTGACTGTAGACAAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGAC 270
 TCTGGGCTCTATTACTGTACAAGAACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACACGGTCAACCGTCTCCTCAGCC 342 (SEC ID N° 13)

Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S C K A S G Y T F T
 S N Y I N W V K Q R P G Q G L E W I G N I Y P S D G F T N Y

CDR1

CDR2

N Q K F K D R A T L T V D K S S T A Y M Q L S S P T S E D

S A V Y Y C T R R N F D V W G A G T T V T V S S A (SEC ID N° 14)

CDR3

CDR1: S N Y I N (SEC ID N° 15)

CDR2: N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D (SEC ID N° 16)

CDR3: N F D V (SEC ID N° 17)

FIG. 16A

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCTCAGTCTTGGAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGTCAGAGCCCTTGTC 90
 CACAGTAATGGAAAACACCTATTATTACAGTGGTACCTGACAGAACCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACACAGTTTCCAAACCGATTT 180
 TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGCCAGATTTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTT 270
 TATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCTTTCACGTTCCGGGACAAAGTTGGAAATAAAA 336 (SEC ID N° 18)

D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V

CDR1

H S N G N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P K L L I Y T V S N R F

CDR2

S G V P D R F S G S G S G P D F T L K I S R V E A E D L G V
Y F C S Q S T H V P F T F G S G T K L E I K (SEC ID N° 19)

CDR3

CDR1: R S S Q S L V H S N G N T Y L Q (SEC ID N° 20)

CDR2: T V S N R F S (SEC ID N° 21)

CDR3: S Q S T H V P F T (SEC ID N° 22)

FIG. 16B

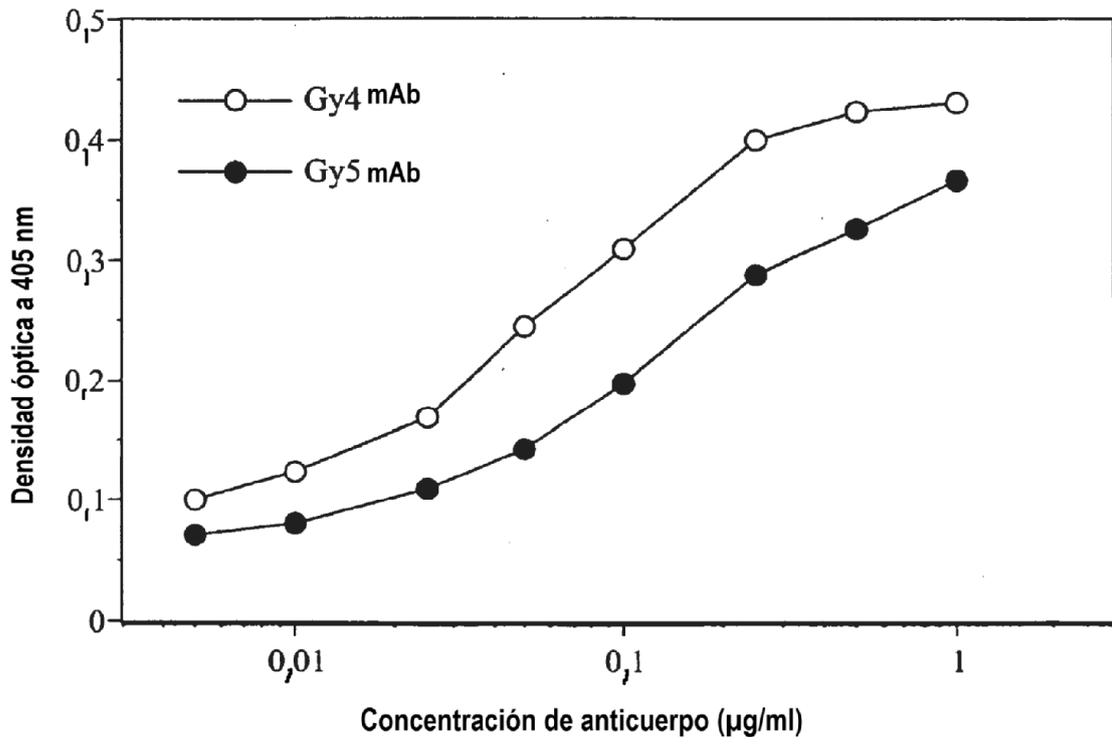


FIG. 17

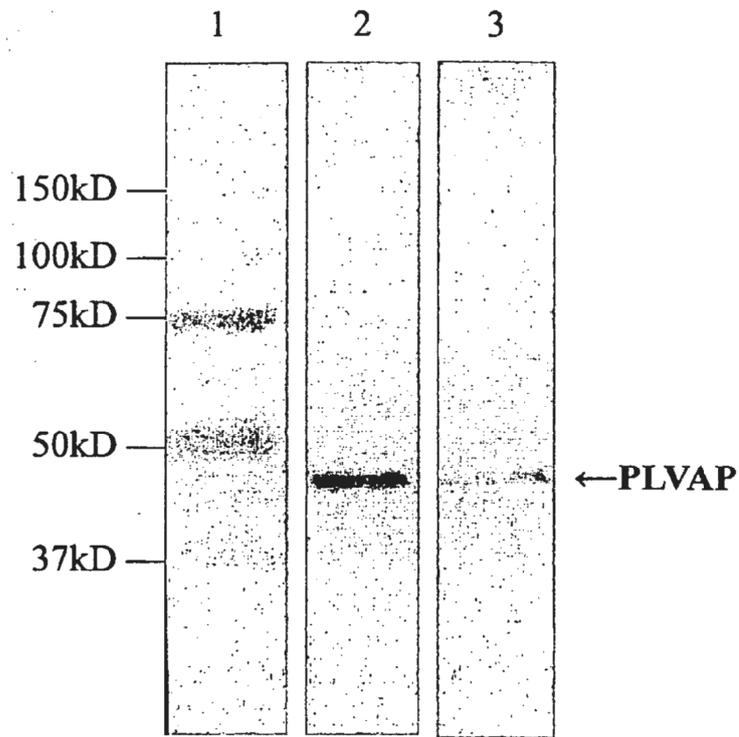


FIG. 18

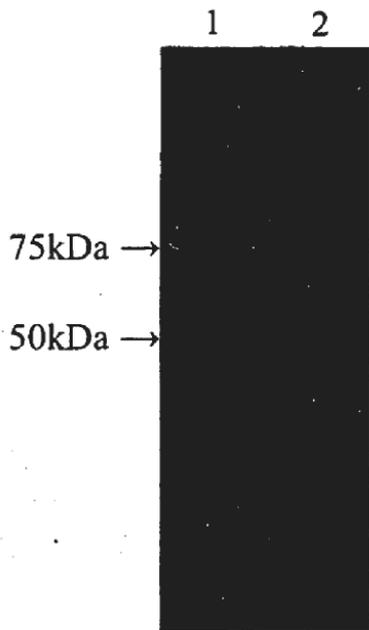


FIG. 19A

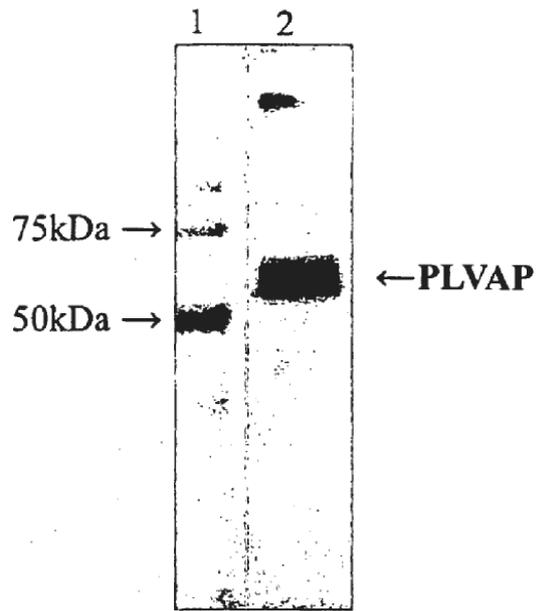


FIG. 19B

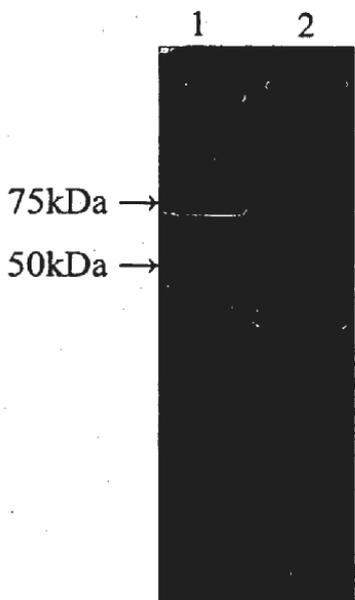


FIG. 19C

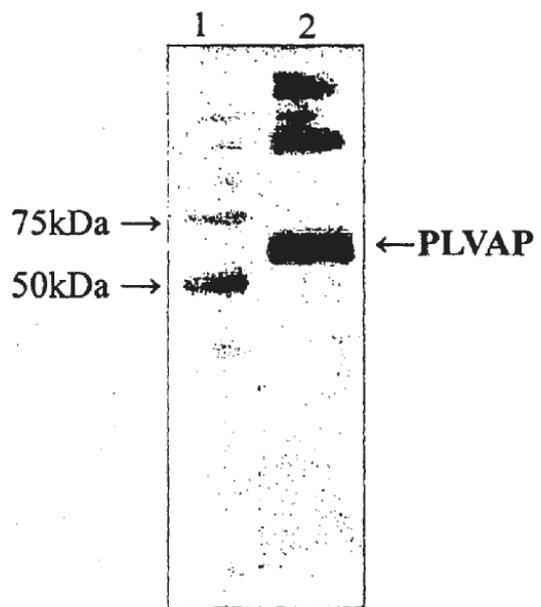


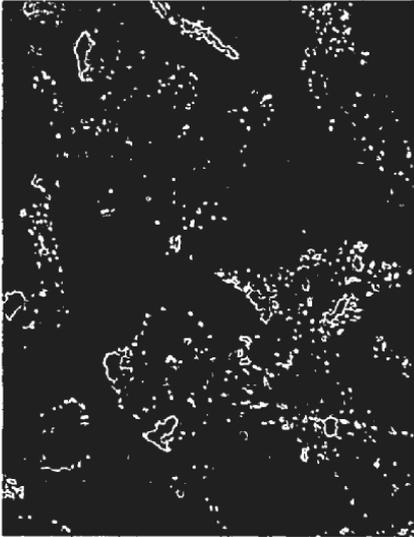
FIG. 19D

FIG. 20A



IgG de ratón

FIG. 20B



vWF de ratón

FIG. 20C



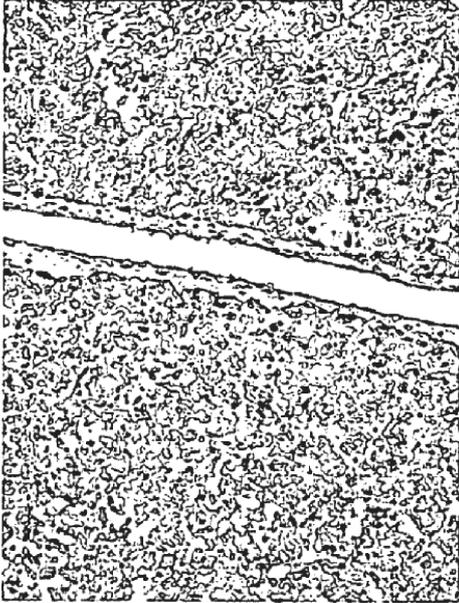
KFCC-GY4

FIG. 20D



KFCC-GY5

FIG. 21B



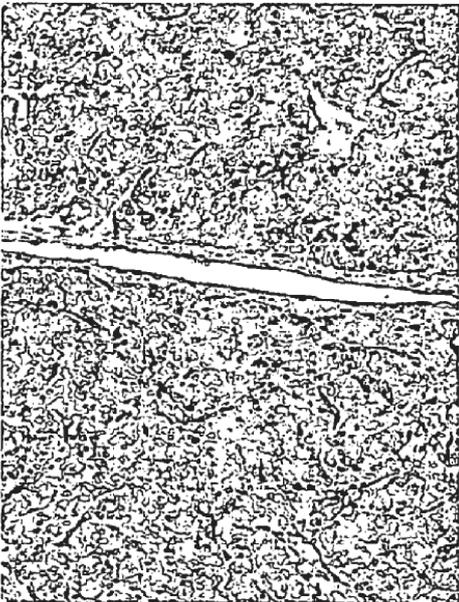
A-GY5

FIG. 21D



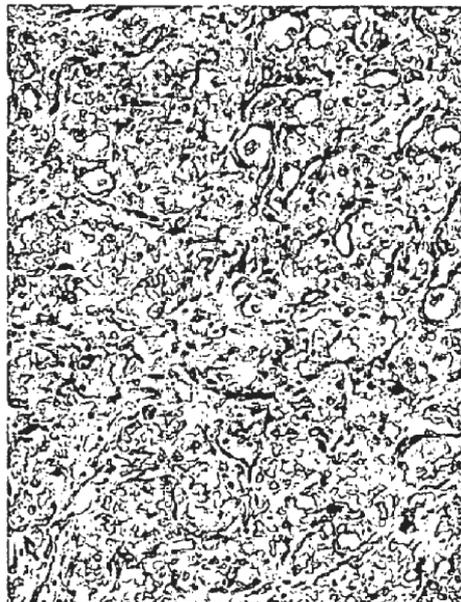
B-GY5

FIG. 21A



A-GY4

FIG. 21C



B-GY4

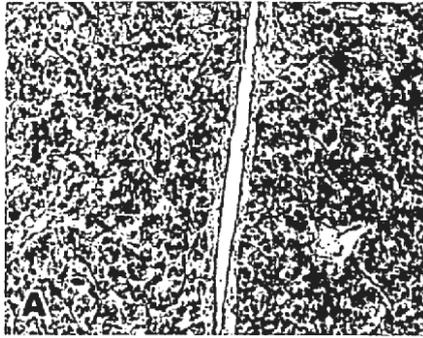


FIG. 22A

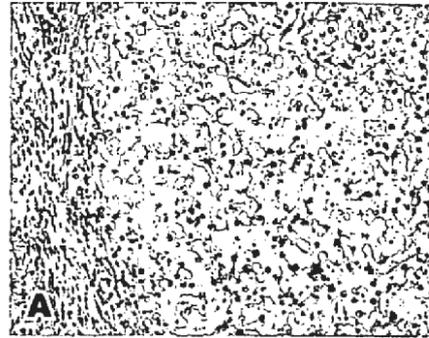


FIG. 22B

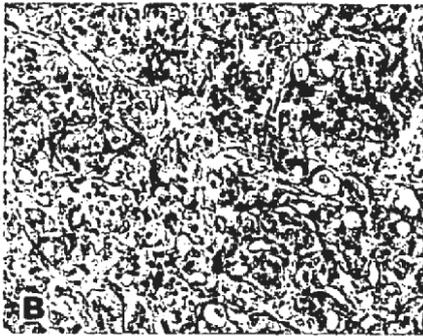


FIG. 22C

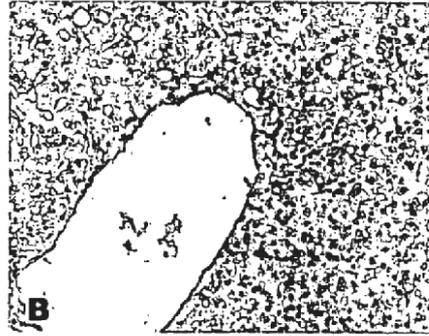


FIG. 22D

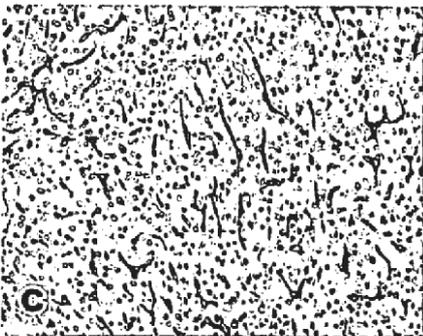


FIG. 22E

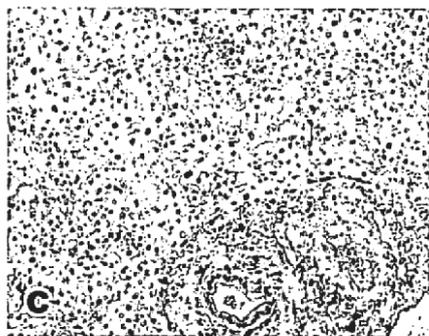


FIG. 22F



FIG. 22G



FIG. 22H

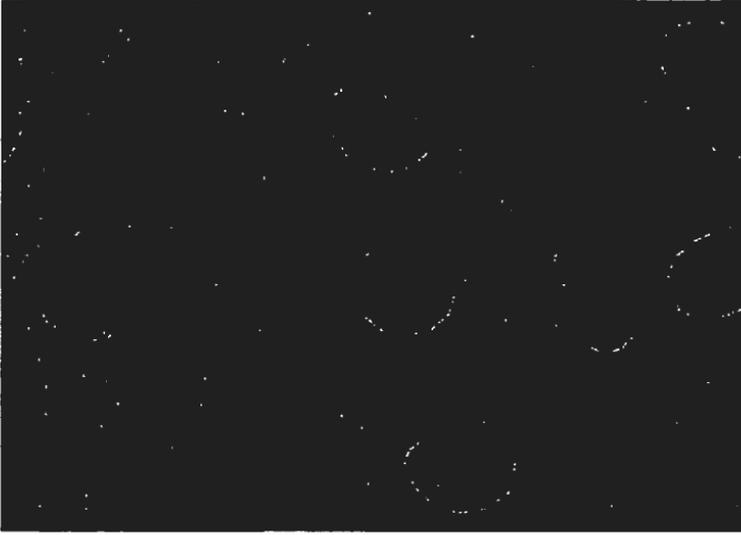


FIG. 23A

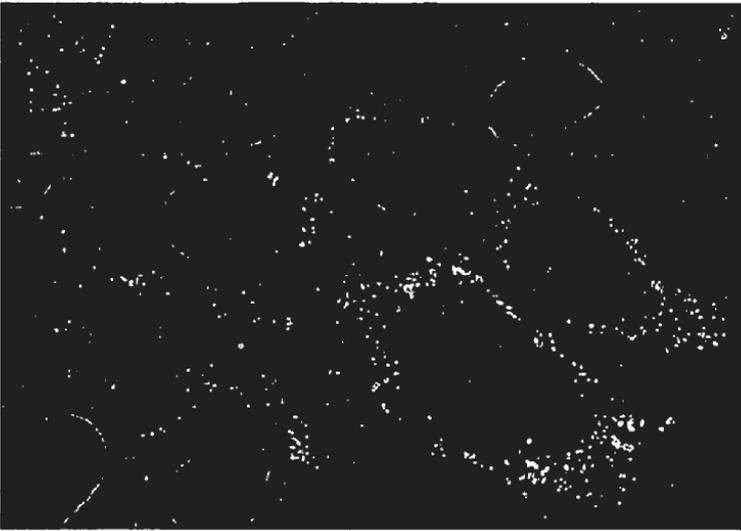


FIG. 23B

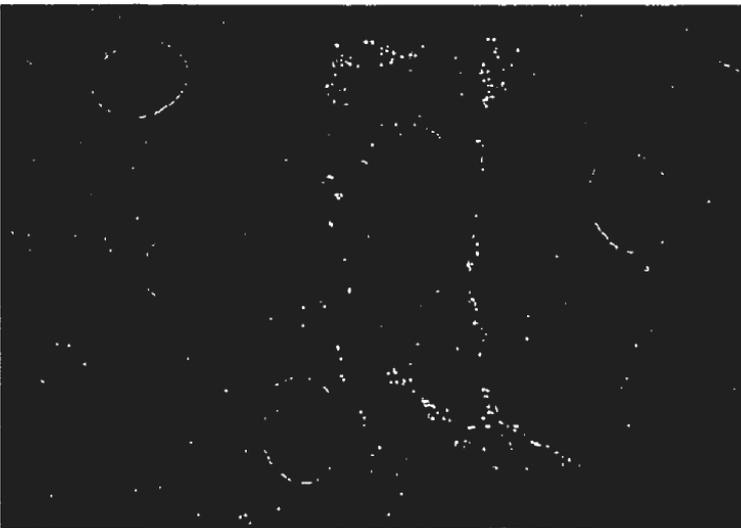


FIG. 23C

1 mglamehggs yaraggssrg cwyylyryffl fvsliaqflii lglvlfmvyg nvhvstesnl
61 qaterraegl ysqllgltas qsnltkelnf ttrakdaimq mwlnarrdld rinasfrqcg
121 gdrviytnq rymaaiilse kqcrdqfkd m nkscdallfm lnqkvktlev eiakektict
181 kdkesvllnk rvaeeqlvec vktrelqhge rqlakeqlqk vqalcpldk dkfemdlrnl
241 wrdsiiprsl dnlgynlyhp lgselasirr acdhmpslms skveelarsl radiervare
301 nsdlqrqkle aqqglrasqe akqkvekeaq areaklqaec srqtqlalee kavlrkerdn
361 lakeleekkr eaeqlrmela irnsaldtci ktksgpmpv srpmgvpnp qpdpaslee
421 fkrkilesqr ppagipvaps sg (SEC ID N° 23)

FIG. 24

1 cggacgcgtg ggtgagcagg gacggtgcac cggacggcgg gatcagagcaa atgggtctgg
 61 ccatggagca cggaggggtcc tacgctcggg cggggggcag ctctcggggc tgctgggtatt
 121 acctgcgcta cttcttcctc ttctgtctccc tcatccaatt cctcatcadc ctggggctcg
 181 tgctcttcat ggtctatggc aacgtgcacg tgagcacaga gtccaacctg caggccaccg
 241 agcgcgagc cgagggccta tacagtcagc tcctagggct cagggcctcc cagtccaact
 301 tgaccaagga gctcaacttc accaccgcgg ccaaggatgc catcatgcag atgtggctga
 361 atgctcggcg cgacctggac cgcacatg ccagcttccg ccagtgccag ggtgaccggg
 421 tcatctacac gaacaatcag aggtacatgg ctgccatcat cttgagtgag aagcaatgca
 481 gagatcaatt caaggacatg aacaagagct gcgatgcctt gctcttcag ctgaatcaga
 541 aggtgaagac gctggaggtg gagatagcca aggagaagac catttgcact aaggataagg
 601 aaagcgtgct gctgaacaaa cgcgtggcgg aggaacagct ggttgaatgc gtgaaaaccc
 661 gggagctgca gcaccaagag cgcagctgg ccaaggagca actgcaaaag gtgcaagccc
 721 tctgcctgcc cctggacaag gacaagttt agatggacct tcgtaacctg tggagggact
 781 ccattatccc acgcagcctg gacaacctgg gttacaacct ctaccatccc ctgggctcgg
 841 aattggcctc catccgcaga gcttgcgacc acatgccag cctcatgagc tccaaggtgg
 901 aggagctggc cgggagcctc cgggcggata tcgaacgcgt ggcccgcgag aactcagacc
 961 tccaacgcca gaagctggaa gccagcagg gcttgcgggc cagtcaggag gcgaaacaga
 1021 aggtggagaa ggaggtcag gcccgggagg ccaagctcca agctgaatgc tcccggcaga
 1081 cccagctagc gctggaggag aaggcgggtgc tgcggaagga acgagacaac ctggccaagg
 1141 agctggaaga gaagaagagg gaggcggagc agctcaggat ggagctggcc atcagaaact
 1201 cagccttggc cacctgcac aagaccaagt cgcagccgat gatgccagtg tcaaggccca
 1261 tgggcccctgt ccccaacccc cagcccatcg acccagctag cctggaggag ttcaagagga
 1321 agatccttga gtcccagagg ccccctgcag gcatccttgt agccccatcc agtggctgag
 1381 gaggctccag gcctgaggac caaggatgg cccgactcgg cggtttgagg aggatgcagg
 1441 gatatgctca cagcgcgca cacaaccccc tcccgcgcc cccaaccacc cagggccacc
 1501 atcagacaac tccttgcag caaaccccta gtacccttc acaccgcac ccgcgctca
 1561 cgatccctca cccagagcac acggccgcgg agatgacgtc acgcaagcaa cggcgctgac
 1621 gtcacatadc accgtggtga tggcgtcacg tggccatgta gacgtcacga agagatatag

FIG. 25A

ES 2 527 072 T3

1681 cgatggcgtc gtgcagatgc agcacgtcgc acacagacat ggggaacttg gcatgacgtc
1741 acaccgagat gcagcaacga cgtcacgggc catgtcgaag tcacacatat taatgtcaca
1801 cagacgcggc gatggcatca cacagacggg gatgatgtca cacacagaca cagtgacaac
1861 acacaccatg acaacgacac ctatagatat ggcaccaaca tcacatgcac gcatgccctt
1921 tcacacacac tttctacca attctcacct agtgtcacgt tccccgacc ctggcacacg
1981 ggccaaggta cccacaggat cccatcccct cccgcacagc cctgggcccc agcacctccc
2041 ctctccagc ttctggcct cccagccact tctcacccc cagtgcctgg acccggaggt
2101 gagaacagga agccattcac ctccgctcct tgagcgtgag tgtttcagg accccctcgg
2161 ggccctgagc cgggggtgag ggtcacctgt tgtcgggagg ggagccactc cttctcccc
2221 aactcccagc cctgcctgtg gcccggtgaa atggtggtgg cacttaataa atattagtaa
2281 atccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa (SEC ID N° 24)

FIG. 25B