

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 808**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2012 PCT/EP2012/051793**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12104386**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2012 E 12702523 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2670772**

54 Título: **Antagonistas de GRASP55 para su uso como un medicamento**

30 Prioridad:

**02.02.2011 EP 11305106**

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

**16.03.2017**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR y  
UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE - AIX-MARSEILLE II (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AURRAND-LIONS, MICHEL y  
ZARUBICA, ANA**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 605 808 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

Antagonistas de GRASP55 para su uso como un medicamento

5 **[0001]** La presente solicitud desvela antagonistas de la proteína de apilamiento y de reensamblaje del aparato de Golgi de 55 kDa (Grasp55), para su uso como un medicamento, en particular para su uso en el tratamiento de enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, en particular, enfermedades que implican MCAM o JAM. Según algunas realizaciones desveladas en la presente memoria descriptiva, dichos antagonistas de la proteína de apilamiento y de reensamblaje del aparato de Golgi de 55 kDa (Grasp55) pueden usarse en el  
10 tratamiento de cáncer, metástasis y enfermedades inflamatorias. La presente solicitud desvela además procedimientos para la detección selectiva de compuestos susceptibles de tratar o prevenir dichas enfermedades.

**[0002]** La proteína Grasp55 es una proteína del aparato de Golgi medial que desempeña un papel en el conjunto del aparato de Golgi, anclaje de vesículas y progresión mitótica y que se ha implicado en el transporte  
15 intracelular de la proteína de unión Acil-CoA, CD8 $\alpha$ , TGF- $\alpha$  y Frizzled-4 (para revisión: Vinke FP, Grieve AG, Rabouille C. *Biochem J.* 2011 Feb 1; 433(3):423-33. Review). Se ha comunicado que GRASP55 interacciona con MT1 MMP en células tumorales HT1080 y afecta a su actividad de proteinasa. Al mismo tiempo, GRASP55 interacciona con furina, PC5/6B y PC7, que están implicadas en la activación de pro-MT1-MMP. Roghi y col. (*FEBS Journal*, 2010, 277, 3158-3175) desvelan que Grasp55 interacciona con MT1-MMP (*metaloproteinasa de matriz de membrana de tipo 1*) y furina y desempeña un papel en la activación dependiente de furina de MT1-MMP. Sin embargo, ningún estudio comunica o sugiere que Grasp55 puede desempeñar un papel en el cáncer o en las enfermedades inflamatorias.

**[0003]** Como contraste a lo anterior, se sabe que las CAM en particular MCAM y JAM están implicadas en el  
25 cáncer o en enfermedades inflamatorias. Más en particular, se ha mostrado que la diseminación superficial de JAM-C por metaloproteinasas (proteínas ADAM) es responsable de la angiogenia sostenida observada en una enfermedad inflamatoria crónica como la artritis. Por otra parte, se ha demostrado también que el aumento de la expresión de JAM-C está correlacionada con un aumento del potencial de metástasis de las variantes de células cancerosas espontáneas sobre todo en fibrosarcoma y melanomas. También sucede para la JAM-A en cáncer de  
30 mama o CD146 en melanomas. (Conn EM y col. *J Biol Chem.* 2008 Sep 26; 283(39):26518-27; Fuse C y col. *J Biol Chem.* 2007 Mar 16; 282(11):8276-83; Lamagna y col. *Cancer Res.* 2005. 65:5703-5710). Este hecho concuerda con estudios previos que muestran que la sobreexpresión de JAM-C está correlacionada con un aumento de la migración de glioblastoma y células de carcinoma pulmonar, y que al bloquear la interacción de JAM-C con su ligando JAM-B inhibe la angiogenia, el crecimiento tumoral y la invasión (Mandicourt G, y col., *J Biol Chem.* 2007 Jan  
35 19; 282(3):1830-7; Tenan M, y col. *Glia.* 2010 Apr; 58(5):524-37; Reynolds LE, y col. *Nature.* 2010 Jun 10; 465(7299):813-7; Imhof y col. *J Pathol.* 2007. 212:198-208; Ody y col. *Leukemia.* 2007 21:1285-1293; documentos US-7.642.341; US-2010/034.737; WO-03/106.647; WO-2006/084.078). Se ha propuesto así que la inhibición de JAM-B o JAM-C permite tratar el cáncer y las enfermedades inflamatorias.

40 **[0004]** Sin embargo, las moléculas de adhesión JAM-B y JAM-C descubiertas hace más de diez años se han descrito como reguladoras de la biología de las plaquetas, las células endoteliales y las células hematopoyéticas junto con la JAM-A. Los miembros de la familia JAM comprenden dos dominios Ig extracelulares de tipo V y C2, una única región transmembrana y un dominio citoplásmico corto que termina con un motivo de unión PDZ en el extremo C. La técnica anterior ha propuesto así que la inhibición de la interacción de JAM-C con JAM-B permitirá el  
45 tratamiento de cáncer y enfermedades inflamatorias por medio de AMc dirigidos contra JAM-C y el bloqueo de la interacción con JAM-B (documentos WO-2008/038.127, WO-2005/050.213). Sin embargo, dado que JAM-A y JAM-C se expresan en plaquetas humanas, el patrón de expresión puede conducir posiblemente a un fallo de las moléculas de direccionamiento de dominios extracelulares. (Langer HF, y col., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:1463-1470; Naik MU, y col. *Blood.* 2012, Jan 23; Santoso S, y col. *J Exp Med.* 2002; 196:679-691; Sobocka MB, y col.,  
50 *Blood.* 2000; 95:2600-2609) Por otra parte, el uso de moléculas de direccionamiento de anticuerpos de estas proteínas puede no ser adecuado para el tratamiento de pacientes debido a los efectos secundarios de los anticuerpos en las plaquetas humanas. Así sucede especialmente en pacientes que sufren cáncer y enfermedades inflamatorias en los que el riesgo de síndrome de coagulación intravascular diseminada es alto. Esto incluye pacientes con inflamación grave, malignidades hematológicas o cánceres metastásicos con alto riesgo de  
55 coagulación intravascular diseminada (Franchini M, y col. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36:388-403; Levi M, y col. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36:367-377; Pinto F, y col. *Arch Ital Urol Androl.* 2009; 81:212-214) para los cuales estará indicado inhibir la expresión de JAM-A y JAM-C o liberar por otros medios que usan reactivos que se dirigen al dominio extracelular de JAM que podría contribuir a la activación de plaquetas (es decir, anticuerpos contra JAM-A o JAM-C).

**[0005]** El cáncer es uno de los principales problemas de salud en los países desarrollados en la actualidad. El cáncer es una proliferación no regulada de células debido a la pérdida de controles normales, que produce crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión del tejido local y, a menudo, metástasis. El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido u órgano en cualquier edad.

**[0006]** Algunos cánceres son curables si se detectan en un estadio temprano, y también es posible tratarlos a largo plazo en estadios posteriores. Sin embargo, la curación no siempre es posible y en algunos casos avanzados no se intenta, en los cuales los cuidados paliativos proporcionan mejor calidad de vida que el tratamiento agresivo, especialmente en ancianos o en pacientes con trastornos comórbidos subyacentes.

**[0007]** Además, algunos cánceres son difíciles de curar o incurables por el momento. Por ejemplo, el pronóstico general para el cáncer de pulmón es sombrío. El tiempo medio de supervivencia para carcinoma microcítico de pulmón (CMCP) de estado limitado es de 20 meses, con una tasa de supervivencia a 5 años del 20%. Los pacientes con un CMCP en estadio extenso tienen un pronóstico especialmente sombrío, con una tasa de supervivencia a 5 años inferior al 1%.

**[0008]** Además, numerosos sistemas modelo sugieren que las proteínas ADAM, tales como ADAM-10 y ADAM-17, tienen una implicación causal en la formación/progresión de tumores. En cáncer humano, las ADAM específicas están reguladas por aumento, con niveles que se correlacionan generalmente con parámetros de progresión del tumor y resultado sombrío. En modelos preclínicos, los inhibidores ADAM selectivos contra ADAM-10 y ADAM-17 han demostrado que tienen sinergia con las terapias existentes al reducir el crecimiento del tumor. Las proteínas ADAM se consideran dianas potenciales para el tratamiento de cáncer, especialmente las malignidades que dependen de ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . Sin embargo, los inhibidores de ADAM tienen numerosos efectos secundarios.

**[0009]** Por tanto, existe una necesidad en la técnica de compuestos capaces de tratar cánceres, en particular de cánceres para los que no existe un tratamiento eficaz por el momento.

**[0010]** El tratamiento de las enfermedades inflamatorias es otra cuestión importante en el campo de la medicina. De hecho, la inflamación es un síntoma que está presente en una inmensa variedad de enfermedades humanas. Por tanto, existe también en la técnica una necesidad de compuestos capaces de tratar las enfermedades inflamatorias.

### 35 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

**[0011]** Los autores de la invención han encontrado inesperadamente que la JAM-B interacciona con Grasp55. Usando bioquímica y sistema de doble híbrido en levadura, se reveló una interacción directa entre Grasp55 y JAM-A, JAM-B y JAM-C. Además, se encontró una interacción entre Grasp55 y CD146 usando ensayos de coinmunoprecipitación.

**[0012]** Los autores de la invención han encontrado que estas interacciones están mediadas a través de motivos PDZ de GRASP55 preferentemente a través de I primer motivo PDZ de GRASP55 (denominado en lo sucesivo en la presente memoria descriptiva dominio PDZ1 y compuesto por fragmentos PDZ1+II y PDZ1') y motivos intracelulares en los extremos C de estas proteínas.

**[0013]** Los autores de la invención conjeturaron que Grasp55 es un adaptador intracelular que regula el transporte de proteínas JAM a la superficie celular y su liberación desde la superficie celular. Para verificar esta hipótesis, los autores de la invención identificaron el dominio mínimo de Grasp55 necesario para que su interacción con JAM-A, JAM-B y JAM-C sea el fragmento PDZ1'. A continuación se evaluó el efecto biológico del silenciamiento de Grasp55 en células endoteliales y tumorales. Como paradigma, se agotó en las células la expresión de Grasp55 por medio de ARN<sup>i</sup> y se evaluaron las consecuencias en la expresión y la liberación de JAM-C. Se encontró que el silenciamiento de la expresión de Grasp55 reduce la expresión de la molécula de adhesión JAM-C así como su liberación de las células endoteliales inflamatorias y tumorales, y también reduce la migración de las células tumorales.

**[0014]** Se realizaron experimentos *in vivo* en ratones, y se encontró que el silenciamiento de Grasp55 permite reducir el desarrollo de metástasis pulmonar.

**[0015]** Por tanto, los autores de la invención han demostrado que los antagonistas Grasp55 pueden usarse para tratar enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, en particular, enfermedades que implican MCAM o JAM. Según algunas realizaciones desveladas en la presente memoria descriptiva, los autores de la invención han demostrado que los antagonistas Grasp55 pueden usarse para tratar el cáncer, las metástasis y la enfermedad inflamatoria, más en particular liberación de moléculas de adhesión de células endoteliales inflamatorias, cánceres que implican moléculas de adhesión celular tales como cánceres que implican CD146 o JAM. Según se cree dichos antagonistas son especialmente ventajosos dado que la supervivencia de líneas celulares silenciadas para expresión de Grasp55 revela que la inhibición funcional de Grasp55 no es tóxica. Además, los presentes antagonistas representan una mejora técnica importante para los planteamientos que implican moléculas que se dirigen a dominios extracelulares de las JAM. De hecho, JAM-A y JAM-C se expresan fuertemente en la superficie de plaquetas humanas, reproduciendo el uso de antagonistas contra dominios de JAM-A y JAM-C extracelulares que pueden inducir una difícil activación de plaquetas o agregación.

**[0016]** Los autores de la invención desarrollaron ensayos ELISA y HTRF para medir la interacción Grasp55/JAM-C. Estos ensayos son herramientas óptimas para la detección selectiva de fármacos. De hecho, permiten la detección selectiva de compuestos de los que se espera que inhiban la expresión de proteínas de la superficie celular (en particular expresión JAM) sin el uso de moléculas de direccionamiento extracelular.

**[0017]** Finalmente, los autores de la invención han demostrado que Grasp55 está implicada en las funciones reguladoras de ADAM-10 y ADAM-17 en la liberación de JAM-A y JAM- y así los antagonistas Grasp55 pueden ser una alternativa ventajosa a los inhibidores ADAM en el tratamiento de enfermedades que implican moléculas de adhesión celular y en particular en cáncer o enfermedades inflamatorias que implican moléculas de adhesión celular.

**[0018]** La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 11.

#### **Antagonistas de Grasp55 para su uso como un medicamento**

**[0019]** Los autores de la invención han encontrado que los antagonistas Grasp55 son capaces de reducir la expresión de la molécula de adhesión JAM-C así como su liberación. Se cree así que los antagonistas Grasp55 son capaces de tratar o prevenir enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, en particular, enfermedades que implican CD146 o JAM, cáncer, enfermedades inflamatorias, así como de inhibir la angiogenia. Según algunas realizaciones desveladas en la presente memoria descriptiva, se cree así que los antagonistas Grasp55 son capaces de tratar o prevenir la liberación de moléculas de adhesión de células endoteliales inflamatorias, cánceres que implican moléculas de adhesión celular tales como cánceres que implican CD146 o JAM. Además, los autores de la invención han demostrado que dichos antagonistas permiten reducir el desarrollo de la metástasis pulmonar *in vivo*.

**[0020]** Por tanto, la presente solicitud desvela un antagonista de la proteína de apilamiento y de reensamblaje del aparato de Golgi de 55 kDa (Grasp55), para su uso como un medicamento. Más específicamente, la presente solicitud desvela un antagonista de Grasp55 para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, en particular, enfermedades que implican CD146 o JAM o una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis y enfermedades inflamatorias. Según algunas realizaciones, la presente solicitud desvela un antagonista de Grasp55 para su uso en el tratamiento o la prevención de liberación de moléculas de adhesión de células endoteliales inflamatorias, cánceres que implican moléculas de adhesión celular tales como cánceres que implican CD146 o JAM. La solicitud desvela además un procedimiento para tratar a un paciente que sufre enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, en particular, enfermedades que implican CD146 o JAM comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antagonista de Grasp55 a un individuo que lo necesita.

**[0021]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "moléculas de adhesión" o "CAM" o "moléculas de adhesión celular" se refiere a proteínas situadas en la superficie celular implicadas en la unión con otras células o con la matriz extracelular (error estándar de la media) tales como proteínas JAM o moléculas de adhesión de células de melanoma (MCAM).

**[0022]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "enfermedades que implican moléculas de adhesión celular" se refiere a cualquier tipo de enfermedad en el que las moléculas de adhesión celular se conocen o se describen como desreguladas, sobreexpresadas o subexpresadas o como inductoras o potenciadoras de la patogenia o la progresión patológica. A modo de ejemplo, JAM-C y CD146 se han descrito como sobreexpresadas en melanoma (Langer HF. y col., Cancer Res. 2011 Jun 15; 71(12):4096-105; Zeng Q, y col., Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Dec 30). En cambio, la JAM-A se ha descrito como subexpresada en cánceres de mama

(Naik MU, y col., Cancer Res. 2008 Apr 1; 68(7):2194-203). Una "enfermedad que implica CAM" puede ser una enfermedad para la cual existen indicaciones para su tratamiento usando anticuerpos que inhiben la actividad CAM. En un aspecto adicional, la "enfermedad que implica CAM" puede ser una enfermedad en la que se observa expresión desregulada de expresión de CAM. Para los expertos en la materia, este hecho puede apreciarse mediante pruebas de expresión de CAM que usan citometría de flujo, inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa, transferencia Western en muestras patológicas en comparación con tejido sano.

5 [0023] En otro aspecto la desregulación de las CAM podría apreciarse dosificando las CAM solubles presentes en líquidos biológicos tales como líquido sinovial, ascitis, suero, plasma, saliva, orina de los pacientes en comparación con donantes sanos usando ELISA, RIA, etc.

[0024] En algunas realizaciones, los ejemplos de dichas enfermedades pueden ser cáncer, metástasis y enfermedades inflamatorias.

15 [0025] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "enfermedades que implican MCAM o JAM", "enfermedades que implican CD146 o JAM" se refiere a cualquier enfermedad en la que se sabe o se describe que las proteínas MCAM (en particular CD146) o JAM están desreguladas o son inductoras o potenciadoras de la patogenia o la progresión patológica. Ejemplos de dichas enfermedades pueden ser cáncer, metástasis y enfermedades inflamatorias. De hecho, se sabe que CD146 y JAM-A se asocian con migración celular en melanoma, cáncer de mama y carcinoma de colon, mientras que la JAM-C se ha asociado con migración celular en glioblastoma, carcinoma pulmonar y fibrosarcoma.

25 [0026] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "cánceres que implican moléculas de adhesión celular", "cánceres que implican MCAM o JAM" o "cánceres que implican CD146 o JAM" se refieren a cualquier cáncer o estadios de cáncer en los que se sabe o se describe que las moléculas de adhesión celular o MCAM tales como las proteínas CD146 o JAM están desreguladas o son inductoras o potenciadoras de la patogenia o la progresión patológica. En particular, algunos estadios de cáncer durante la progresión patológica tales como crecimiento del tumor, invasión o metástasis que implican específicamente moléculas de adhesión celular.

30 [0027] La solicitud desvela además un procedimiento para tratar a un paciente que sufre una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis y enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antagonista de Grasp55 a un individuo que lo necesita.

35 [0028] En una primera realización, la enfermedad que se tratará o prevendrá según la invención es un cáncer. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "cáncer" se refiere a cualquier tipo de tumor maligno (es decir, no benigno). El tumor maligno puede corresponder a un tumor primario o a un tumor secundario (es decir, una metástasis). Además, el tumor puede corresponder a un tumor maligno sólido, que incluye por ejemplo carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, melanomas, mesoteliomas, blastomas, o a un cáncer de la sangre tal como leucemias, linfomas y mielomas. El cáncer puede corresponder por ejemplo a un carcinoma sólido, un melanoma, un cáncer de pulmón (lo que incluye pero no se limita a carcinomas pulmonares no microcíticos (CPNMC), carcinoma microcítico de pulmón (CMCP), célula carcinomas microcíticos combinados, blastomas pleuropulmonares, tumores carcinoides, carcinomas sarcomatoides, tumores carcinoides, carcinomas adenoescamosos, carcinomas pulmonares de células escamosas, adenocarcinomas y carcinomas pulmonares de células grandes), un cáncer encefálico (lo que incluye pero no se limita a gliomas, glioblastomas, astrocitomas, oligoastrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas), cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, síndrome mielodisplásico y leucemia.

50 [0029] Dado que los autores de la invención han encontrado que los antagonistas de Grasp55 reducen la migración de melanoma *in vitro* (véase figura 7) y reducen el desarrollo de metástasis pulmonar *in vivo* (véase figura 11), el cáncer objeto de tratamiento o prevención según la invención corresponde preferentemente a un cáncer secundario (por ejemplo, metástasis), o un cáncer del que se sabe que tiene un potencial metastásico elevado.

[0030] También preferentemente, la solicitud desvela preferentemente un antagonista de Grasp55 para su uso en la prevención de metástasis.

[0031] En una segunda realización, la enfermedad objeto de tratamiento o prevención según la invención es una enfermedad inflamatoria. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "enfermedad inflamatoria" se refiere a cualquier enfermedad en la que existe una inflamación. Los ejemplos de enfermedades

inflamatorias incluyen pero no se limitan a asma, enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, artritis reumatoide, arteriosclerosis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, etc.), prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, pancreatitis, rechazo de trasplante, sarcoidosis, vasculitis, cistitis intersticial, alergias, miopatías inflamatorias e infección.

5

**[0032]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "antagonista de Grasp55" se refiere a un compuesto que inhibe o reduce la actividad biológica de Grasp55. La actividad biológica de Grasp55 depende de la cantidad de la proteína en el interior de las células (es decir, su nivel de expresión) así como en la actividad de la proteína. Por tanto, el antagonista de Grasp55 puede reducir o inhibir la expresión de GRASP55, o la actividad de la

10

**[0033]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "proteína de apilamiento y de reensamblaje del aparato de Golgi de 55 kDa", abreviado como "Grasp55", comprende cualquier isoforma de ocurrencia natural de la proteína Grasp55, lo que incluye la proteína Grasp55 murina de la SEQ ID NO: 1, la proteína

15

**[0034]** Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente si un compuesto es un antagonista de Grasp55. Por ejemplo, los expertos en la materia pueden valorar si un compuesto reduce o suprime la expresión de Grasp55 por transferencia Western o por RT-PCR. La actividad biológica de Grasp55 puede medirse también valorando la capacidad de Grasp55 de unirse a sus compañeros de unión naturales tales como JAM-A, JAM-B, JAM-C o CD146. La unión de Grasp55 a uno de sus compañeros de unión puede valorarse por ejemplo usando el ensayo de inmunoprecipitación, el ensayo de afinidad en solución, los ensayos ELISA o HTRF o el sistema de doble híbrido en levadura (Y2H) que se describen en detalle en los Ejemplos de la presente memoria descriptiva. La unión de la

25

inhibición a compuestos de Grasp55 para al menos una de JAM-A, JAM-B, JAM-C o CD146 se define como un antagonista de Grasp55. Alternativamente, la actividad biológica de Grasp55 puede determinarse a través de la medida de la liberación de JAM solubles, por ejemplo, tal como se describe más adelante en los Ejemplos. Un compuesto que reduce o suprime la liberación de JAM soluble se define como un antagonista de Grasp55.

30

**[0035]** En una realización desvelada en la presente memoria descriptiva, el antagonista es capaz de reducir la cantidad de Grasp55 en células. Preferentemente, dicho antagonista es un ácido nucleico que se dirige a un ARNm que codifica Grasp55.

35

**[0036]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un ácido nucleico que "se dirige a" un ARNm se refiere a un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a dicho ARNm. Es decir, el ácido nucleico comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria, preferentemente perfectamente complementaria, a una región de la secuencia de dicho ARNm, siendo dicha complementariedad suficiente para producir la unión específica en condiciones intracelulares.

40

**[0037]** Como resultará evidente de inmediato para los expertos en la materia, una secuencia que es "perfectamente complementaria a" una segunda secuencia significa la contraparte de complemento inversa de la segunda secuencia, ya sea en forma de una molécula de ADN o en forma de una molécula de ARN. Una secuencia es "parcialmente complementaria a" una segunda secuencia si existe una o más faltas de correspondencia.

45

**[0038]** Los ácidos nucleicos que se dirigen a un ARNm que codifica Grasp55 pueden diseñarse usando la secuencia de dicho ARNm como base, por ejemplo, usando herramientas bioinformáticas.

50

**[0039]** Los ácidos nucleicos según la invención son capaces de reducir la cantidad de Grasp en las células, por ejemplo, en células cancerosas tales como células de melanoma de ratón B16F10. En los Ejemplos se proporcionan procedimientos para la determinación de si un ácido nucleico es capaz de reducir la cantidad de Grasp55.

55

**[0040]** Los ácidos nucleicos según la invención pueden corresponder por ejemplo a oligonucleótidos antisentido o a ARN interferente (lo que incluye ARNip, ARNhc, miARN, ARNbc y otras especies de ARN que pueden escindir *in vivo* para formar ARNip).

**[0041]** Los ácidos nucleicos para su uso según la invención tienen normalmente una longitud de 12 a 50 nucleótidos, por ejemplo, 12 a 35 nucleótidos, de 12 a 30, de 12 a 25, de 12 a 22, de 15 a 35, de 15 a 30, de 15 a 25, de 15 a 22, de 18 a 22, o de 19, 20 ó 21 nucleótidos.

- [0042]** Los ácidos nucleicos para su uso según la invención pueden por ejemplo comprender o consistir en de 12 a 50 nucleótidos consecutivos, por ejemplo, de 12 a 35, de 12 a 30, de 12 a 25, de 12 a 22, de 15 a 35, de 15 a 30, de 15 a 25, de 15 a 22, de 18 a 22, o aproximadamente 19, 20 ó 21 nucleótidos consecutivos de una secuencia 5 complementaria al ARNm que codifica Grasp55.
- [0043]** La presente invención proporciona varios ácidos de ARNip y ARNhc específicos que se dirigen a un ARNm que codifica Grasp55 que ha demostrado que reduce de manera eficaz la cantidad de Grasp55 en células (véanse Ejemplos 3 y 4).
- 10 **[0044]** Por tanto, el ácido nucleico para su uso según la invención preferentemente comprende o consiste en un fragmento de al menos 5, 8, 10, 12, 15, 18, 19, 20 ó 21 nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 6-10, 12 y 13 (ya sea en forma de ADN, o en forma de ARN, o en forma de un híbrido de ADN/ARN).
- 15 **[0045]** También preferentemente, puede comprender o consistir en la región correspondiente de un ARNm de Grasp55 obtenido de otra especie (por ejemplo, la región correspondiente de un ARNm de Grasp55 humano). La región correspondiente en otra especie puede ser identificada fácilmente por los expertos en la materia alineando las secuencias de los ARNm de Grasp55.
- 20 **[0046]** Con la máxima preferencia, el ácido nucleico que se dirige a un ARNm que codifica Grasp55 es un ARN interferente (ARNi).
- [0047]** El término "ARNi" incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado (ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante), así como ARN alterado 25 que difiere del ARN de ocurrencia natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótidos, por ejemplo, en el o los extremos del ARN o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). Los nucleótidos en las moléculas de ARNi de la presente invención también pueden comprender nucleótidos no estándar, que incluyen nucleótidos de ocurrencia no natural o desoxirribonucleótidos. Colectivamente, todos los compuestos de ARNi alterado se refieren 30 como análogos o análogos de ARN de ocurrencia natural. Los ARNi de la presente invención sólo deben ser suficientemente similares al ARN natural que tiene la capacidad de mediar en la interferencia de ARN. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva la frase "mediar en la interferencia de ARN" se refiere a e indica la capacidad de distinguir qué ARNm serán afectados por el proceso o la maquinaria de interferencia de ARN. El ARN que media en la interferencia de ARN interacciona con la maquinaria de interferencia de ARN de tal manera que dirige la 35 maquinaria para degradar ARNm en particular o para reducir por otros medios la expresión de la proteína diana. En una realización, la presente invención se refiere a moléculas de ARNi que dirigen la escisión de ARNm específico al que corresponde su secuencia. No es necesario que exista una correspondencia perfecta de las secuencias, sino que la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARNi dirija la inhibición de la interferencia de ARN por escisión o falta de expresión del ARNm diana.
- 40 **[0048]** Las moléculas de ARNi de la presente invención pueden comprender una porción de ARN y alguna porción adicional, por ejemplo, una porción de desoxirribonucleótido. El número total de nucleótidos en la molécula de ARN es de forma adecuada menor que 49 para que sean mediadores eficaces de la interferencia de ARN. En moléculas de ARN preferidas, el número de nucleótidos es de 16 a 29, más preferentemente de 18 a 23, y con la 45 máxima preferencia 21-23.
- [0049]** Tal como se indica anteriormente, el término "ARNi" incluye pero no se limita a ARNip, ARNhc, miARN, ARNbc, y otras especies de ARN que pueden escindirse *in vivo* para formar ARNip.
- 50 **[0050]** Un "ARN interferente pequeño" o "ARNip" comprende un dúplex de ARN (región bicatenaria) y puede comprender además uno o dos salientes monocatenarios, salientes 3' o 5'.
- [0051]** Un "ARN horquillado corto (ARNhc)" se refiere a un segmento de ARN que es complementario a una porción de un gen diana (complementario a uno o más transcritos de un gen diana), y tiene una estructura en forma 55 de bucle (horquilla).
- [0052]** Los "microARN" o "miARN" son ARN codificados endógenamente que tienen aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, que regulan genes diana de forma postranscripcional y que se expresan generalmente de una forma altamente específica del tejido o específica de la fase de desarrollo. Se puede diseñar y expresar miARN

artificiales basándose en las características de los genes de miARN existentes. Puede usarse la arquitectura del miR-30 (microARN 30) para expresar miARN (o ARNip) de los plásmidos de expresión del promotor de la ARN polimerasa II (Zeng y col., 2005, Methods Enzymol. 392:371-380). En algunos casos las moléculas de miARN precursor pueden incluir más de una estructura en horquilla. Las múltiples estructuras en horquilla pueden estar relacionadas entre sí a través de un conector como, por ejemplo, un conector de ácidos nucleicos, una secuencia flanqueante de miARN, otras moléculas, o alguna combinación los mismos.

**[0053]** Los ácidos nucleicos empleados como moléculas antisentido o de ARNi pueden modificarse, preferentemente modificarse químicamente, con el fin de aumentar la estabilidad y/o la eficacia terapéutica de los ácidos nucleicos *in vivo*. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden emplearse como derivados de fosfortioatos (sustitución de un átomo de oxígeno de fosforilo sin puente por un átomo de azufre) que tienen mayor resistencia a la digestión de nucleasa. También es eficaz la modificación MOE (estructura principal ISIS).

**[0054]** En una realización específica, el ácido nucleico para su uso según la invención es:

- a) un ARNip que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO. 6-10;
- b) un ARNhc que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 12 y una secuencia de la SEQ ID NO: 13;
- c) un ARNip o a ARNhc que se dirige a la misma región del ARNm que codifica Grasp55 que el ARNip de (a) o el ARNhc de (b) (por ejemplo, la misma región en otra especie, especialmente en la especie humana).

**[0055]** En otra realización desvelada en la presente memoria descriptiva, el antagonista es capaz de inhibir la interacción de Grasp55 con uno de sus compañeros de unión, en particular compañeros de unión que se unen específicamente a uno de la lista de los dominios PDZ de Grasp55 tales como el primer dominio PDZ de Grasp55 (desde el extremo N de Grasp55). Preferentemente, el antagonista es capaz de inhibir la interacción de Grasp55 con una molécula de adhesión de unión (JAM) o una molécula de adhesión de células de melanoma (MCAM). Tal como se indica anteriormente en la presente memoria descriptiva, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente **si un compuesto es capaz de inhibir la interacción de Grasp55 con uno de sus compañeros de unión usando los procedimientos proporcionados en la presente memoria descriptiva.**

**[0056]** Preferentemente, dicho antagonista de Grasp55 es capaz de **"unirse específicamente"** a Grasp55. Los procedimientos para determinar si el antagonista es capaz de unirse específicamente a Grasp55 son bien conocidos para los expertos en la materia. Dichos procedimientos incluyen por ejemplo ensayos de dosis-respuesta con un ligando competitivo, coinmunoprecipitación, ensayos de afinidad en solución, resonancia plasmónica de superficie (por ejemplo, usando BIACore), HTRF y ensayos de doble híbrido en levadura. En la presente memoria descriptiva, el término "unión específica" a una proteína tiene el significado habitual en la técnica, y se usa para calificar una unión como contraposición a una "unión no específica".

**[0057]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "molécula de adhesión a células de melanoma" o "MCAM" comprende en particular las proteínas CD146.

**[0058]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "molécula de adhesión de unión" o "JAM" comprende en particular las proteínas JAM-A, JAM-B y JAM-C.

**[0059]** Por "JAM-A" se entiende cualquier isoforma de ocurrencia natural de la proteína JAM-A, que incluye la proteína JAM-A murina de la SEQ ID NO: 3, la proteína JAM-A humana de la SEQ ID NO: 23, variantes alélicas de las mismas, variantes de empalme de las mismas y proteínas homólogas en otras especies.

**[0060]** Por "JAM-B" se entiende cualquier isoforma de ocurrencia natural de la proteína JAM-B, que incluye la proteína JAM-B murina de la SEQ ID NO: 4, la proteína JAM-B humana de la SEQ ID NO: 24, variantes alélicas de las mismas, variantes de empalme de las mismas y proteínas homólogas en otras especies.

**[0061]** Por "JAM-C" se entiende cualquier isoforma de ocurrencia natural de la proteína JAM-B, que incluye la proteína JAM-C murina de la SEQ ID NO: 5, la proteína JAM-C humana de la SEQ ID NO: 25, variantes alélicas de las mismas, variantes de empalme de las mismas y proteínas homólogas en otras especies.

**[0062]** La solicitud desvela que dicho antagonista capaz de inhibir la interacción de Grasp55 con uno de sus compañeros de unión puede por ejemplo seleccionarse entre el grupo que consiste en una molécula pequeña, un anticuerpo, un aptámero y un péptido.

**[0063]** Preferentemente, el antagonista desvelado en la presente memoria descriptiva es una molécula química, con la máxima preferencia una molécula química pequeña.

**[0064]** En el marco de un procedimiento de tratamiento o prevención, el antagonista se administra en una "cantidad eficaz" a un paciente, es decir, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir la enfermedad. Se observará que esta cantidad variará con la eficacia del antagonista empleado, y con la naturaleza de cualquier vehículo usado. La determinación de las cantidades apropiadas para cualquier composición dada se encuentra dentro de los conocimientos de la técnica, a través de series estándar de pruebas diseñadas para evaluar los niveles terapéuticos apropiados.

10

**[0065]** El paciente es preferentemente un individuo humano. Sin embargo, también se contempla el uso veterinario del antagonista según la presente invención. El paciente puede corresponderse así también con un individuo no humano, preferentemente un mamífero no humano.

**[0066]** El término "tratamiento" se entiende como un procedimiento terapéutico, es decir, un procedimiento destinado a curar, mejorar el estado y/o prolongar la vida de un individual que sufre una enfermedad. Por "prevención" se entiende un procedimiento profiláctico, es decir, un procedimiento dirigido a prevenir la aparición de al menos algunos de los síntomas de dicha enfermedad (por ejemplo, en el marco del cáncer, la prevención incluye la reducción del riesgo de recidiva y la reducción del riesgo de aparición de metástasis).

20

#### **Grasp55 para su uso como diana**

**[0067]** Tal como se indica anteriormente, los antagonistas de Grasp55 son útiles como medicamentos para tratar o prevenir enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, en particular, enfermedades que implican CD146 o JAM. Más en particular, los antagonistas de Grasp55 son útiles como medicamentos para tratar o prevenir cáncer que implica moléculas de adhesión celular o enfermedades que implican CD146 o JAM. La presente solicitud desvela ventajosamente procedimientos para identificar nuevos antagonistas de Grasp55. En particular, los autores de la invención han encontrado que un polipéptido que comprende o que consiste en los aminoácidos 1 a 208, preferentemente, 1 a 160, más preferentemente 1 a 107 de Grasp55 murino, puede usarse como diana para identificar antagonistas de Grasp55.

30

**[0068]** Por tanto, la presente solicitud desvela el uso de Grasp55, o de un polipéptido que comprende los aminoácidos 1 a 208, preferentemente, 1 a 160, más preferentemente 1 a 107 de Grasp55 murino o la región correspondiente de una proteína Grasp55 obtenida de otra especie, como diana para la detección selectiva de compuestos susceptibles de ser medicamentos, en particular compuestos susceptibles de tratar o prevenir una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis y una enfermedad inflamatoria.

35

**[0069]** Más específicamente, la presente solicitud desvela un procedimiento para la detección selectiva de compuestos susceptibles de ser medicamentos, por ejemplo, compuestos susceptibles de tratar o prevenir una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, enfermedades que implican CD146 o JAM, en particular seleccionadas entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis y enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

40

a) suministro de un primer polipéptido que comprende los aminoácidos 1 a 208, preferentemente, 1 a 160, más preferentemente 1 a 107 de Grasp55 murino o la región correspondiente de una proteína Grasp55 obtenida de otra especie, o una célula que expresa dicho primer polipéptido;

45

b) suministro de un segundo polipéptido que es un compañero de unión de Grasp55, o una célula que expresa dicho segundo polipéptido;

c) suministro de un compuesto candidato;

50

d) determinación de si dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la unión de dicho primer polipéptido a dicho segundo polipéptido;

en el que la determinación de que dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido indica que dicho compuesto candidato es susceptible de ser un medicamento, por ejemplo, un compuesto susceptible de tratar o prevenir cáncer, metástasis y enfermedad inflamatoria.

55

**[0070]** La determinación de si dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la unión de dicho primer polipéptido a dicho segundo polipéptido comprende normalmente las etapas siguientes:

- i. evaluación de la unión del primer polipéptido al segundo polipéptido en ausencia del compuesto candidato;
- ii. evaluación de la unión del primer polipéptido al segundo polipéptido en presencia del compuesto candidato;
- iii. comparación de los resultados obtenidos en las etapas (i) y (ii);

5 con lo que una unión reducida en la etapa (ii), comparada con la unión en la etapa (i), indica que el compuesto candidato es capaz de inhibir la unión de dicho primer polipéptido a dicho segundo polipéptido;

**[0071]** Como será evidente para los expertos en la materia, el procedimiento anterior se realiza *in vitro*.

10 **[0072]** Por un compuesto "inclinado a" o "susceptible de" tratar o prevenir una enfermedad se entiende un compuesto que según se cree es capaz de tratar o prevenir dicha enfermedad. Dicho compuesto corresponde normalmente a un compuesto que se selecciona para ensayos preclínicos o clínicos con el fin de confirmar su capacidad de tratar o prevenir la enfermedad. En el campo del descubrimiento de fármacos, dichos compuestos se refieren a veces como "líderes" o "impactos".

15

**[0073]** El primer polipéptido que se usa en el procedimiento desveladas en la presente memoria descriptiva comprende los aminoácidos 1 a 208, preferentemente, 1 a 160, más preferentemente 1 a 107 de Grasp55 murino (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 1) o la región correspondiente de una proteína Grasp55 obtenida de otra especie. De hecho, los autores de la invención han encontrado que esta región, que comprende el dominio PDZ I y el dominio PDZ II de Grasp55, es necesaria y suficiente para sostener la interacción con los compañeros de unión de Grasp55.

20

**[0074]** Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la "región correspondiente de una proteína obtenida de otra especie", llevando a cabo una alineación de secuencias usando, por ejemplo, el programa de alineación del servidor ExPASy Proteomics. Por ejemplo, la región de Grasp55 humano que corresponde a los aminoácidos 1 a 208, preferentemente, 1 a 160, más preferentemente 1 a 107 de Grasp55 murino es de aminoácidos 1 a 208, preferentemente, 1 a 160, más preferentemente 1 a 107 de Grasp55 humano (véase la alineación de secuencias de la Figura 10).

25

**[0075]** Por tanto, el primer polipéptido puede por ejemplo comprender o consistir en:

30

- a) una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (es decir, Grasp55 murino);
- b) una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (es decir, Grasp55 humano);
- c) aminoácidos 1 a 208, preferentemente, 1 a 160, más preferentemente 1 a 107 de la SEQ ID NO: 1;
- d) aminoácidos 1 a 208, preferentemente, 1 a 160, más preferentemente 1 a 107 de la SEQ ID NO: 2; o
- 35 e) una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a la secuencia de uno cualquiera de (a) a (d), siempre que dicho primer polipéptido esté biológicamente activo (es decir, siempre que conserve la capacidad de unión a al menos uno, preferentemente todos, los compañeros de unión naturales de Grasp55).

35

40 **[0076]** Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, el 95% "idéntica" a una secuencia de búsqueda de aminoácidos de la presente invención, se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto es idéntica a la secuencia de búsqueda con la salvedad de que la secuencia de polipéptidos objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de búsqueda. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de búsqueda, hasta el 5% (5 de 100) de los residuos de aminoácidos en la secuencia objeto pueden insertarse, suprimirse o sustituirse por otro aminoácido.

45

**[0077]** En el marco de la presente solicitud, el porcentaje de identidad se calcula usando una alineación global (es decir, las dos secuencias se comparan en toda su longitud). Los procedimientos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Puede usarse, por ejemplo, el programa de «aguja», que usa el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) para encontrar la alineación óptima (incluyendo los huecos) de dos secuencias cuando se consideran en toda su longitud. El programa de aguja está disponible por ejemplo en la página web ebi.ac.uk. El porcentaje de identidad de acuerdo con la invención se calcula es preferentemente usando el programa EMBOSS::aguja (global) con un parámetro de "hueco abierto" igual a 10,0, un parámetro de "hueco extendido" parámetro igual 0,5 y una matriz Blosum62.

50

55

**[0078]** Los mutantes que consisten en una secuencia de aminoácidos "al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntico" a una secuencia de referencia puede comprender mutaciones tales

como deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. En el caso de sustituciones, el mutante que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a una secuencia de referencia puede corresponder a una secuencia homóloga derivada de otra especie de mamífero que la secuencia de referencia. En otra realización preferida, la sustitución corresponde preferentemente a una sustitución conservadora tal como se indica en la tabla mostrada a continuación.

| Sustituciones conservadoras            | Tipo de aminoácido                                       |
|--|--|
| Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp | Aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas alifáticas  |
| Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys                | Aminoácidos con cadenas laterales sin carga pero polares |
| Asp, Glu                               | Aminoácidos con cadenas laterales ácidas                 |
| Lys, Arg, His                          | Aminoácidos con cadenas laterales básicas                |
| Gly                                    | Cadena lateral neutra                                    |

**[0079]** El segundo polipéptido es un compañero de unión de Grasp55. Puede ser un compañero de unión de Grasp55 de ocurrencia natural, o un polipéptido que comprende o que consiste en un fragmento del mismo, siempre que dicho fragmento conserva la capacidad de unirse a Grasp55. Los compañeros de unión pueden seleccionarse por ejemplo entre el grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende o que consiste en los aminoácidos 260 a 299 de molécula de adhesión de unión A (JAM-A) murina (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 3), o la región correspondiente de una proteína JAM-A obtenida de otra especie;
- b) un polipéptido que comprende o que consiste en los aminoácidos 258 a 298 de molécula de adhesión de unión B (JAM-B) murina (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 4), o la región correspondiente de una proteína JAM-B obtenida de otra especie;
- c) un polipéptido que comprende o que consiste en los aminoácidos 263 a 310 de molécula de adhesión de unión C (JAM-C) murina (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 5), o la región correspondiente de una proteína JAM-C obtenida de otra especie;
- d) un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de CD146, o un fragmento de la misma, siempre que dicho fragmento conserva la capacidad de unirse a Grasp55;
- e) un polipéptido que comprende o que consiste en los aminoácidos 260 a 299 de JAM-A humana (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 23);
- f) un polipéptido que comprende o que consiste en los aminoácidos 260 a 298 de JAM-B humana (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 24);
- g) un polipéptido que comprende o que consiste en los aminoácidos 263 a 310 de JAM-C humana (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 25);
- h) un polipéptido que comprende o que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO. 35 a 40; y
- i) un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a los aminoácidos 260 a 299 de JAM-A murina, a los aminoácidos 260 a 299 de JAM-A humana, a los aminoácidos 258 a 298 de JAM-B murina, a los aminoácidos 260 a 298 de JAM-B humana, a los aminoácidos 263 a 310 de JAM-C murina, a los aminoácidos 263 a 310 de JAM-C humana, o a una cualquiera de las SEQ ID NO. 35 a 40;

**[0080]** "CD146" también conocida como molécula de adhesión de células de melanoma (MCAM) o glucoproteína de la superficie celular MUC18, es una molécula de adhesión celular de 113 kDa. "CD146" se entiende como cualquier isoforma de ocurrencia natural de la proteína CD146 (también referida como la glucoproteína de la superficie celular MUC18), que incluye la proteína CD146 murina, la proteína CD146 humana, variantes alélicas de las mismas, variantes de empalme de las mismas y proteínas homólogas en otras especies. La secuencia de CD146 humana se muestra por ejemplo en la base de datos UniProtKB nº de entrada P43121 (versión nº 103 con fecha de 30 de noviembre de 2010).

**[0081]** La determinación de si el compuesto candidato es capaz de inhibir la unión de dicho primer polipéptido a dicho segundo polipéptido puede realizarse por ejemplo usando cualquiera de los protocolos descritos en detalle en los ejemplos, por ejemplo, a través de inmunoprecipitación y transferencia Western, citometría de flujo, un ensayo de doble híbrido en levadura o un ensayo ELISA.

**[0082]** En una realización preferida del procedimiento de detección selectiva según la invención, la etapa de determinación de si dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido se realiza a través de ensayos ELISA o HTRF. De hecho, dichos ensayos son especialmente adecuados

para realizar una detección selectiva de alto rendimiento (HTS). Además, es rápida, precisa y permite una medida directa de la interacción.

**[0083]** Más en particular, los autores de la invención han establecido el siguiente ensayo (véase Ejemplo 5).  
 5 Brevemente, el primer polipéptido, que comprende Grasp55 o un fragmento del mismo, se fusiona con glutatión S-transferasa (GST). En consecuencia, el primer polipéptido puede unirse a una placa, por ejemplo, a una placa de múltiples pocillos adecuada para HTS. El segundo polipéptido, que comprende el compañero de unión de Grasp55, se añade a la placa, con o sin el compuesto candidato, y se lava la placa. En ausencia del compuesto candidato, o si  
 10 el compuesto candidato no inhibe la interacción entre el primer polipéptido y el segundo polipéptido, el segundo polipéptido se une al primer polipéptido. A diferencia de ello, si el compuesto candidato inhibe la interacción, el segundo polipéptido se elimina tras el lavado. Además, el segundo polipéptido está biotinilado. Por tanto, tras la adición de una peroxidasa de rábano picante (HRP) unida a estreptavidina, dicha HRP se unirá indirectamente al primer polipéptido sólo si el compuesto candidato no es un antagonista de Grasp55. La unión de la peroxidasa de rábano picante (HRP) al segundo polipéptido (y así el primer polipéptido) puede evaluarse entonces fácilmente por  
 15 adición de un sustrato de HRP cromógeno. Si la densidad óptica (DO) es menor en presencia del compuesto candidato que en ausencia del compuesto candidato, entonces el compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido (es decir, es un antagonista de Grasp55).

**[0084]** Por tanto, en una realización preferida del procedimiento de detección selectiva según la invención, la  
 20 etapa de determinación de si el compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido se realiza a través de un ensayo ELISA en el que:

- el primer polipéptido comprende además una secuencia de aminoácidos que codifica glutatión S-transferasa (GST);  
 y
- 25 - el segundo polipéptido está biotinilado.

**[0085]** Por "glutatión S-transferasa" o "GST" se entiende una enzima capaz de catalizar la siguiente reacción:  
 RX + glutatión  $\rightleftharpoons$  HX + R-S-glutatión (clasificación de enzimas: EC 2.5.1.18). La secuencia de aminoácidos que  
 30 codifica GST puede por ejemplo comprender o consistir en la secuencia de la SEQ ID NO: 22.

**[0086]** La etapa de determinación de si el compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido puede comprender por ejemplo:

- la incubación de una placa (por ejemplo, una placa de múltiples pocillos tal como una placa de noventa y seis  
 35 pocillos) con el primer polipéptido, en la que dicha placa está recubierta con glutatión;
- opcionalmente el lavado de las placas;
- opcionalmente la incubación de las placas (por ejemplo, durante 2 horas) en un tampón de bloqueo (por ejemplo, un tampón que contiene PBS y el 2% de albúmina bovina);
- la adición del segundo polipéptido, en solitario o conjuntamente con el compuesto candidato (por ejemplo, cuando  
 40 se usa una placa de múltiples pocillos, el segundo polipéptido se añade en solitario en al menos un pocillo, y el segundo polipéptido se añade junto con varios compuestos candidatos en los otros pocillos);
- el lavado de las placas (por ejemplo, tres veces);
- la adición de una peroxidasa de rábano picante que está unida a estreptavidina;
- la adición de un sustrato cromógeno de HRP tal como por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-  
 45 diaminobencidina (DAB) o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS);
- la medida de la densidad óptica (DO), por ejemplo, a través de la medida de la absorbancia a una DO de 450 nm. La absorbancia puede medirse por ejemplo en un lector ELISA POLARstar;

en el que la medida de una DO que es menor en presencia del compuesto candidato que en ausencia del  
 50 compuesto candidato indica que el compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido.

**[0087]** Una vez que se ha aislado un compuesto candidato capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido, el procedimiento puede comprender además la etapa de confirmar esta capacidad  
 55 usando otro ensayo, por ejemplo, realizando una transferencia Western para JAM-C o JAM-A, realizando una citometría de flujo para expresión superficial de receptor de adhesión que interacciona con Grasp55, y/o midiendo la liberación de JAM solubles.

**[0088]** Finalmente, el procedimiento puede comprender además la etapa de determinación o confirmación, en

un modelo celular o animal no humano de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, enfermedades que implican CD146 o JAM, cáncer, metástasis y enfermedad inflamatoria, si un compuesto seleccionado tal como se describe anteriormente es capaz de tratar dicha enfermedad. Cuando se usa un modelo de animal no humano, dicho modelo de no animal se sacrifica preferentemente al final del experimento.

**[0089]** Por ejemplo, la capacidad del compuesto para tratar o prevenir el cáncer, en particular para prevenir metástasis, puede evaluarse por ejemplo usando el ensayo de metástasis B16F10. Brevemente, en ratones C57BL76 (por ejemplo, de 15 semanas de vida) puede inyectarse por vía intravenosa, por ejemplo, en la vena retroorbitaria de los ratones (por ejemplo, con  $1 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l), con la línea celular de tumor melanoma B16F10, con el fin de producir metástasis pulmonar experimental. A continuación se sacrifica a los ratones, por ejemplo, después de 14 días. Finalmente, los pulmones pueden inundarse con sangre, aislarse y examinarse en cuanto a la presencia de focos establecidos de metástasis macroscópica en los cinco lóbulos.

**[0090]** Según otro aspecto, la solicitud desvela un procedimiento *in vitro* para determinar la respuesta a una terapia para enfermedades que implican moléculas de adhesión celular, una terapia para enfermedades que implican CD146 o JAM, una terapia antiinflamatoria o una terapia contra el cáncer en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de medir la inhibición de interacciones de Grasp55 con la molécula de adhesión de unión en una muestra biológica de dicho individuo por ejemplo, la realización de una transferencia Western para JAM-C o JAM-A, la realización de una citometría de flujo para expresión superficial de receptor de adhesión que interacciona con Grasp55 y/o la medida de la liberación de JAM solubles.

**[0091]** En algunas realizaciones desveladas en la presente memoria descriptiva, Grasp55, JAM-C soluble y/o JAM-A soluble pueden usarse como biomarcadores de la respuesta a la terapia para enfermedades que implican JAM, una terapia antiinflamatoria o una terapia contra el cáncer en un individuo. El término "biomarcador" significa un indicador distintivo biológico u obtenido por medios biológicos de un proceso, acontecimiento o condición. Tal como se desvela en la presente memoria descriptiva, el nivel de expresión y/o la liberación del biomarcador desvelado en la presente memoria descriptiva, son/es un indicador distintivo de la respuesta de un individuo a la terapia de enfermedades que implican JAM, una terapia antiinflamatoria o una terapia contra el cáncer, en particular, la inhibición de la interacción de Grasp55 con las proteínas JAM.

#### Composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista de Grasp55

**[0092]** La presente solicitud también desvela una composición farmacéutica que comprende un antagonista tal como se desvela en la presente memoria descriptiva y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas formuladas de una manera adecuada para la administración a un ser humano son conocidas por los expertos en la materia. La composición farmacéutica tal como se desvela en la presente memoria descriptiva puede comprender estabilizadores, tampones, y similares. Las composiciones tal como se desvela en la presente memoria descriptiva pueden formularse y usarse en forma de comprimidos, cápsulas o elixires para administración oral, supositorios para administración rectal, soluciones estériles o suspensiones para administración inyectable. La elección de la formulación depende en última instancia de la forma de administración pretendida como por ejemplo una forma de administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral, o una administración local a través de inyección en el tumor. La composición farmacéutica tal como se desvela en la presente memoria descriptiva puede ser una solución o suspensión, por ejemplo, una solución o suspensión inyectable. Por ejemplo puede empaquetarse en forma de dosis unitaria.

**[0093]** Aunque tienen distintos significados, los términos "que comprende", "que tiene", "que contiene" y "que consiste en" pueden sustituirse unos por otros en el conjunto de la descripción de la invención.

**[0094]** En el marco de la presente descripción, todos los compuestos, polipéptidos y péptidos pueden aislarse y/o purificarse opcionalmente.

**[0095]** La invención se evaluará además a la vista de los siguientes ejemplos y figuras.

#### 55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**[0096]**

**Figura 1:** Los miembros JAM y CD146 interaccionan con un nuevo compañero intracelular GRASP55. Las

interacciones endógenas de JAM-A, JAM-B, JAM-C y CD146 con Grasp55 se muestran por medio de inmunoprecipitación en células de melanoma B16F10 o células de ratón endoteliales de pulmón primarias (LMEC). También se muestra la afinidad peptídica en solución usando un péptido que corresponde a los últimos 19 aminoácidos de JAM-B y JAM-C, o un péptido suprimido de los tres últimos aminoácidos. Como controles se usaron lisados celulares totales. A continuación se resolvieron las proteínas on SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti-GRASP55. Las flechas indican la señal que corresponde a Grasp55.

**Figura 2:** Caracterización de dominios de interacción de Grasp55 y proteínas JAM-A, JAM-B, JAM-C por ensayo de doble híbrido en levadura. Panel izquierdo: Representación esquemática de construcciones usadas para doble híbrido en levadura. Para confirmar y extender la interacción observada usando bioquímica, los autores de la invención desarrollaron un procedimiento doble híbrido en levadura con el fin de cartografiar los dominios de interacción de Grasp55 y JAM-A, JAM-B y JAM-C. Dado que se han comunicado cuatro isoformas de GRASP55, que difieren en su extremo C o por la presencia del primer dominio PDZ; los autores de la invención generaron varias construcciones de GRASP55 en el sistema de vectores de doble híbrido GAL4 (Clontech Laboratories, Inc). Panel derecho: Resultados de doble híbrido en levaduras. Se muestran los resultados de la matriz de interacción usando las construcciones representadas anteriormente. Un punto blanco indica crecimiento de levadura y representa una interacción positiva. La cola citoplásmica de MAGUK 7 RTK se usó como control negativo. Las construcciones que contenían los motivos de unión PDZ de JAM-A, JAM-B y JAM-C interaccionan con Grasp55 de tipo silvestre (wt), pero no con Grasp55 que carece del primer dominio PDZ ni con los dominios PDZ primero o segundo aislados de GRASP55. Esto sugiere que el primer dominio PDZ de Grasp55 es necesario, pero no suficiente para soportar esta interacción, lo que indica que diferentes isoformas de Grasp55 pueden interaccionar diferencialmente con las JAM.

**Figura 3:** El silenciamiento de Grasp55 controla la estabilidad de proteínas de JAM-C en células B16F10. Panel izquierdo: La inhibición de expresión de GRASP55 en células B16F10 por direccionamiento de secuencias de ARNi se determinó por análisis RT-qPCR. La transfección de direccionamiento GRASP55 (siGRASP#1, 2, 3, 4) y diana sin control ARNip (sicontrol) se llevó a cabo usando Lipofectamina 2000, y la expresión de genes diana y de control interno se analizó 12 horas después de la transfección. La expresión de GRASP55 se normaliza a HPRT de ratón y se presenta como el nivel de cambio en la expresión con respecto a células tratadas con ARNip sin direccionamiento de control. (panel central) 12 h después de la transfección, se analizaron los lisados celulares en cuanto a la expresión de proteínas GRASP55 y JAM-C. Se midió la disminución en la expresión de células de GRASP55 así como en la de JAM-C en células GRASP55 silenciadas en comparación con células tratadas con ARNip de control mientras que la expresión total de actina no se modificó. Panel derecho: El nivel de transcritos JAM-C no cambia tras la transfección de células B16F10 con ARNip dirigido contra GRASP55. En conjunto estos resultados indican que el silenciamiento de GRASP55 no afecta a la transcripción de JAM-C pero disminuye los niveles de expresión de proteínas, lo que indica que la estabilidad de la proteína JAM-C está comprometida.

**Figura 4:** El silenciamiento de Grasp55 altera la expresión de superficie celular de JAM-C en células B16F10. Panel superior: La inhibición de expresión de GRASP55 en células B16F10 por secuencia de ARNi que se dirige a GRASP55 se determinó por análisis RT-qPCR. La transfección de direccionamiento GRASP55 (siGRASP#01 o siGRASP#1) y diana sin control de ARNip (sicontrol) se llevó a cabo usando Lipofectamina 2000, y se analizó la expresión de genes diana y de control interno 48 horas después de la transfección. La expresión de GRASP55 se normaliza a HPRT de ratón y se presenta como el nivel de cambio en la expresión con respecto a células tratadas con ARNip sin direccionamiento de control. Panel inferior: Histograma que muestra la intensidad de fluorescencia relativa media de expresión de superficie celular de JAM-C en GRASP55 de ARNip o células diana sicontrol. El primer histograma corresponde a control de isotipos para anticuerpo JAM-C.

**Figura 5:** El silenciamiento de expresión de Grasp55 en células de melanoma de B16F10 reduce la liberación de JAM-C soluble. La cantidad de JAM-C soluble presente en sobrenadantes de cultivo celular de células B16F10 transfectadas con el ARNip indicado se midió mediante ensayos ELISA realizados en sobrenadantes de cultivo concentrados. Los resultados indican que la JAM-C soluble está presente en sobrenadante de células B16F10 ( $0,27 \pm 0,02$  ng/ml, histograma gris oscuro). La cantidad de JAM-C soluble disminuye en sobrenadantes de cultivo celular de B16F10 tras el silenciamiento de la expresión de GRASP55 por medio de ARNhc ( $0,21 \pm 0,01$  ng/ml, histograma blanco). Como controles positivos y negativos, se usó JAM-C de ratón soluble recombinante (histograma gris claro) y medio de cultivo celular (histograma negro). Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media.

**Figura 6:** El silenciamiento de GRASP55 altera la expresión de superficie celular de JAM-C en células LMEC. A (panel izquierdo): La inhibición de la expresión de GRASP55 en células LMEC primarias por secuencia de ARNi que se dirige a GRASP55 se determinó por análisis RT-qPCR. La transfección de direccionamiento GRASP55 (siGRASP#01 o siGRASP#1) y direccionamiento ARNip de control (sicontrol) se llevó a cabo usando Lipofectamina 2000, y la expresión de los genes de diana y control interno se analizó 72 horas después de la transfección. La expresión de GRASP55 se normaliza a HPRT de ratón y se presenta como el nivel de cambio en la expresión con respecto a células tratadas con ARNip sin direccionamiento de control. B (panel derecho): El histograma muestra la intensidad de fluorescencia relativa media de expresión de superficie celular de JAM-C en GRASP55 de ARNip o

células endoteliales microvasculares de pulmón direccionadas con sicontrol, LMEC. El primer histograma corresponde a control de isotipos para anticuerpo de JAM-C. RTqPCR, transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; ARNi - interferencia de ARN.

**Figura 7:** La expresión de Grasp55 controla la migración celular en células B16F10. A. Panel superior: La migración celular se estudió mediante ensayos de heridas en células B16F10 direccionadas con GRASP55 ARNip o control de ARNip 48 h después de la transfección. Los gráficos de histogramas representan la velocidad media medida durante 6 h por microscopia de intervalo de tiempo con una cámara de incubación establecida a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. (sicontrol 167613 n = 33; siGRASP55#01 8264 n = 25; siGRASP55#1 9568 nm/min n = 24). B. Panel inferior: Igual que en el otro panel, con la salvedad de que el experimento se realizó usando líneas celulares B16F10 transfectadas de forma estable con diferentes ARNhc (shctrl 24965 n = 34; shGRASP55 18466 n = 21). Los resultados se expresan como velocidad media +/- error estándar de la media, se muestra un experimento representativo.

**Figura 8:** Ensayo ELISA para medida específica de la interacción de Grasp55/JAM-C. (A; Panel superior): Resultados en bruto a partir de ensayo ELISA que usa las moléculas solubles recombinantes indicadas (GST-GRASP55 PDZ I + II, GST-GRASP55 PDZ I y GST) y péptidos de JAM-C biotinilados que corresponden a los últimos 19 aminoácidos (aa) con o sin el motivo de unión PDZ. Se incubaron placas de noventa y seis pocillos recubiertas con glutatión durante toda la noche con varias proteínas de fusión GST. A continuación se lavaron las placas, se bloquearon y se incubaron con los péptidos JAM biotinilados con o sin motivo de unión PDZ. A continuación se reveló la interacción de péptidos JAM con proteínas GST-GRASP55 añadiendo Estreptavidina-HRP y un sustrato de HRP. Los resultados se expresan como media +/- error estándar de la media de unidad de absorbancia relativa medida a 450 nm. (B; Panel inferior): Igual que en el otro panel, aunque los resultados se normalizaron con el control negativo de cada condición experimental, es decir, las señales obtenidas en GST en solitario. Se muestra un experimento representativo.

**Figura 9:** Panel superior: Alineación de péptidos usados en el presente estudio y secuencia de consenso predicha que se une a Grasp55. Se muestran las secuencias que se unen a Grasp55 (JAM-A, JAM-B, JAM-C) o la ausencia de interacción (JAM-AΔ, JAM-BΔ, JAM-CΔ). Se muestra la secuencia de consenso deducida de las propiedades de aminoácidos, en el que los asteriscos resaltan los aminoácidos de la secuencia de consenso. Se predice que todas las secuencias de proteínas que terminan con esta secuencia de consenso interactúan con Grasp55. Para la alineación, se usó el programa Clustal X con lo que:

- 30 - G y A son intercambiables (pequeñas)
- F e Y son intercambiables (aromáticas)
- S y T son intercambiables (nucleófilas)
- D y E son intercambiables (ácidas)
- Q y N son intercambiables (amida)
- 35 - K, H, R son intercambiables (básicas)
- V, L, I son intercambiables (hidrófobas)

Panel inferior: Los sombreados oscuro y claro indican regiones idénticas y conservadas, respectivamente, para miembros de la familia JAM de ratón y humanos. Los residuos de la secuencia de consenso mostrados en el panel superior están marcados con asteriscos y están contenidos completamente en las regiones conservadas.

**Figura 10:** Se muestra la alineación de secuencias de proteínas de ortólogos de ratón y humano. Secuencia de proteínas de ratón y Grasp55 humano. La comparación de secuencias revela que los dominios PDZ en el extremo N en Grasp55 de ratón y humano, son casi idénticos con una diferencia de un aminoácido en la posición 82 (A>T).

**Figura 11:** El silenciamiento de la expresión de GRASP55 reduce el desarrollo de metástasis pulmonar. A. (Panel superior) Análisis por transferencia Western de la expresión de GRASP55 en la línea celular de melanoma B16F10 establemente que expresa control ARNhc que se dirige a luciferasa (shcontrol) y dos clones ARNhc que se dirigen a la expresión de GRASP55 (shG55/1 y shG55/2). Se usó actina como control de carga. B. (Panel inferior) Se muestra el aspecto macroscópico de pulmones con metástasis de tres grupos de ratones a los que se inyectaron clones de B16F10 que expresan diferente nivel de proteína GRASP55 (shcontrol, shG55/1 y shG55/2). La metástasis aparece como puntos negros en la superficie de los pulmones debido a la presencia de melanina en B16F10, se verificó la presencia de melanina en las tres líneas celulares y no se vio afectada por el silenciamiento Expresión GRASP55. El desarrollo de metástasis pulmonar está correlacionado positivamente con el nivel de expresión de proteína GRASP55. n = 5 ratones por grupo.

**Figura 12: (A, Panel izquierdo)** Los gráficos muestran la unión específica de péptidos indicados para construcciones Grasp-GST-PDZI'. Las señales tienen competencia con dos concentraciones diferentes de péptidos JAM-C no marcados. **(B; Panel derecho)** Los gráficos muestran la unión específica de péptidos indicados para construcciones Grasp-GST-PDZI'+II'. No pudo detectarse unión con el péptido CD146 lo que indica que la presencia del segundo dominio PDZ de Grasp55 en la construcción limita la interacción con péptidos JAM. Las señales tienen competencia con dos concentraciones diferentes de péptidos JAM-C no marcados.

**Figura 13:** El gráfico muestra las curvas de competencia obtenidas con el péptido JAM-C no marcado en las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como señales relativas con respecto a las señales obtenidas en ausencia de péptido en competencia. La EC50 está en el intervalo micromolar bajo para proteínas recombinantes de longitud completa GST-PDZI'+II' y Grasp.

5 **Figura 14:** El gráfico muestra la competencia de péptido JAM-C no marcado con las combinaciones indicadas de péptidos biotinilados y proteínas recombinantes de GST-PDZI'+II' (símbolos huecos) o GST-PDZI' (símbolos negros).

**Figura 15:** Resultados de detección selectiva de biblioteca NINDS: veinte compuestos inhiben de forma significativa la señal en comparación con el valor medio obtenido con control de DMSO en 104 replicados. Algunos de ellos  
10 inhiben preferentemente la interacción de JAM-C con PDZI' (carboplatino), mientras que otros inhiben la interacción con proteínas GST recombinantes de PDZI' y PDZI'+II' (ácido elálgico) o sólo con PDZI'+II' (disulfiram).

**Figura 16:** Los datos resumen los resultados de la detección selectiva de bibliotecas expresada como porcentaje de controles. Tres compuestos (**disulfiram, carboplatino y ácido elálgico**) no modifican la señal obtenida en la condición de control (barras negras) pero inhiben la unión de JAM-C a las construcciones de fusión de GST (barras  
15 sombreadas y barras blancas). Pueden considerarse impactos reales. Otros compuestos tienen sólo efectos ligeros en las señales específicas cuando se comparan con los cambios observados en la condición de control.

**Figura 17: (A, panel izquierdo)** Gráfico que muestra la cantidad de JAM-A soluble detectada por ELISA en el sobrenadante de HUVEC tras 48 horas de la estimulación indicada (NE: no estimulado). **(B, panel derecho)** Igual  
20 que el panel izquierdo con la salvedad de que se detecta JAM-C soluble. Los resultados se expresan como número de veces de aumento con respecto a la cantidad detectada en el sobrenadante de células no estimuladas.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

### [0097]

25

SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de aminoácidos de Grasp55 murino.

SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de aminoácidos de Grasp55 humano.

SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de aminoácidos de JAM-A murina.

SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de aminoácidos de JAM-B murina.

30 SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de aminoácidos de JAM-C murina.

SEQ ID NO. 6 a 10 muestran las secuencias de ARNip que se dirigen a Grasp55.

SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia dirigida por un ARNhc que se dirige a Grasp55.

SEQ ID NO. 12 y 13 muestran la secuencia de las cadenas de sentido directo y antisentido de un ARNhc que se dirige a Grasp55.

35 SEQ ID NO. 14 a 21 muestran las secuencias de cebadores usados en los Ejemplos.

SEQ ID NO: 22 muestra la secuencia de la glutatión S-transferasa usada en el ensayo ELISA para detección de la interacción entre Grasp55 y JAM-C.

SEQ ID NO: 23 muestra una secuencia de aminoácidos de JAM-A humana.

SEQ ID NO: 24 muestra una secuencia de aminoácidos de JAM-B humana.

40 SEQ ID NO: 25 muestra una secuencia de aminoácidos de JAM-C humana.

SEQ ID NO. 26 a 40 muestran las secuencias mostradas en las Figuras 9 y 10.

SEQ ID NO: 41 muestra la secuencia de aminoácidos de ADAM murino 10 usado en el ensayo de doble híbrido en levadura descrito en la Tabla I.

SEQ ID NO: 42 muestra la secuencia de aminoácidos de ADAM murino 17 usado en el ensayo de doble híbrido en  
45 levadura descrito en la Tabla I.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Material y procedimientos

50

Plásmidos, cultivo celular y transfección

### [0098]

Se cultivó la línea celular de melanoma B16F10 (ATCC) en DMEM (Medio Esencial Mínimo de Dulbecco con alto contenido en glucosa, Invitrogen) suplementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10%, L-Glutamina al 1%, penicilina y estreptomina al 1%, piruvato de Na al 1%, aminoácidos esenciales al 1% y 25 µmol/l de β-mercaptoetanol. Se aislaron células endoteliales murinas de pulmón (LMEC) primarias a partir de pulmones de ratón y se cultivaron en DMEM F12 que contenía FCS al 20%, L-Glutamina al 1%, penicilina y estreptomina al 1%, piruvato de Na al 1%, aminoácidos esenciales al 1%, 25 mmol/l de β-mercaptoetanol, 100 µg/ml de ECGS, 10 U/ml de heparina, 1 µg/ml de hidrocortisona, 1 ng/ml de bFGF y 10 ng/ml de EGF.

**[0099]** Se generaron plásmidos que contenían ARNhc contra luciferasa o ARNhc contra GRASP55 y variantes de GRASP55, fusionadas con EYFP o mCherry en plásmidos pSUPER.retro o pEYFP-N1 o pmCherry-N1, respectivamente (Clontech). El ARNhc contra luciferasa fue suministrado amablemente por Michael Sebbagh, 5 CRCM, Marsella.

**[0100]** Se realizaron transfecciones transitorias en una monocapa confluyente al 50% de células B16F10 con 10 nM de ARNip o 5 µg de ARNhc contra luciferasa usados como control o ARNhc contra GRASP55 en Lipofectamina ARNimax (Invitrogen). Se llevó un seguimiento de la eficacia de transfección a 24 h por qRT-PCR y 10 transferencias Western para la expresión de transcrito o proteína GRASP55. Para la selección de transfectantes estables se cultivaron células en DMEM que contenían 10 µg/ml de puomicina (Sigma Aldrich) empezando 48 h después de la transfección.

#### Anticuerpos

15

**[0101]** Se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo JAM-C y JAM-B antirratón inmunizando conejos con las proteínas JAM-C o JAM-B solubles recombinantes que contienen los dominios V<sub>H</sub>-C<sub>2</sub>. Los anticuerpos fueron producidos por Covalab (Lyon, Francia). El anticuerpo monoclonal (AMc) de rata H36 dirigido contra JAM-C de ratón fue descrito anteriormente (Aurrand-Lions y col., 2001a; Aurrand-Lions y col., 2001b; Johnson-Leger y col., 2002b). 20 El AMc CD44 antihumano IgG<sub>2</sub> de rata (Hermes, 9B5) usado como control de isotipos fue descrito anteriormente (Lamagna y col., 2005a). El AMc de rata JB4 contra ratón JAM-B se obtuvo por inmunización de rata con una molécula JAM-B recombinante que contenía los dominios V<sub>H</sub>-C<sub>2</sub>. El AMc H202 de rata contra ratón JAM-A ya ha sido descrito (Malergue). El anticuerpo contra ratón CD146 fue suministrado amablemente por Francoise Dignat-George, 25 Facultad de farmacia, Marsella. Las moléculas GRASP55 y actina se detectaron con anticuerpos adquiridos en Interchim y Sigma Aldrich, respectivamente. Las inmunotransferencias de proteína se sondearon con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Jackson Research Laboratories) y se detectaron con reactivos ECL (Amersham). PE anti-rata y FITC anti-conejo, usados para tinción FACS, se adquirieron en Jackson Immunoresearch Laboratories. Las quimeras JAM-B/Fc y JAM-C/Fc de ratón recombinantes se adquirieron en R&D.

30 Inmunoprecipitación y transferencia Western

**[0102]** Las inmunoprecipitaciones de JAM-A, JAM-B, JAM-C y CD146 de ratón se realizaron con AMc de rata anti-JAM-C 19H36, anti-JAM-B JB4 de rata, anti-JAM-A H202 de rata y anti-CD146 AMM1 de rata y usando HNTG (50 mM Hepes pH = 7,5, EGTA 1 mM, Triton al 1%, Glicerol al 10%, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaF 0,2% e 35 inhibidores de proteasas) o tampón de lisis TNT (Tris 50 mM pH = 7,5, EGTA 1 mM, Triton al 1%, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaF al 0,2% e inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). Después de SDS-PAGE y transferencia de membrana de nitrocelulosa de los inmunoprecipitados, se revelaron las proteínas con anticuerpos anti-GRASP55, anti-JAM-C o anti-actina y posteriormente con HRP anti-conejo (Jackson Immunoresearch Laboratories) y reactivos de detección de ECL (Amersham Pharmacia Biotech). La concentración de proteínas de las muestras se determinó 40 según el método de Bradford.

#### Generación de proteína de fusión GST-GRASP55 y su producción

**[0103]** La proteína GRASP55 de tipo silvestre murina y sus diversos dominios se escindieron del pcDNA3.1+ 45 plásmido en el que se clonaron previamente. Los fragmentos de interés escindidos de pcDNA3.1+ se separaron por electroforesis en gel, se purificaron y se ligaron con pGEX4T1 linealizado que contenía una etiqueta de proteína GST. Estas construcciones se transformaron en las bacterias Rosetta para producir las diversas proteínas GST-GRASP55. Se cultivó un precultivo de una colonia bacteriana de cada de construcción de plásmido durante 16 h en 50 agitación a 37°C en 3 ml de medio LB que contenía ampicilina. Al día siguiente, se inocularon 200 ml de medio LB suplementado con ampicilina con 500 µl de precultivo. Cuando el cultivo bacteriano se encontraba en fase de crecimiento exponencial (DO600 nm = 0,6-0,8), se indujo la biosíntesis de las proteínas dadas por adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, IPTG (0,5 mM) a 22°C durante 16 h. El cultivo bacteriano se centrifugó a 3.000 x g durante 30 min y se lisaron los sedimentos bacterianos en tampón de lisis TNT (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y Tritón al 1%) suplementado con inhibidores de la proteasa (Roche) a 4°C. A continuación se somete la 55 suspensión bacteriana a sonicación 5 veces durante 10 segundos con amplitud del 30% y seguido inmediatamente por una centrifugación durante 40 min a 2.000 x g a 4°C. Estos diversos sobrenadantes bacterianos se verificaron por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie para la expresión de las proteínas de fusión GST-GRASP55.

Ensayo ELISA para detección de la interacción entre GRASP55 y JAM-C.

**[0104]** Para realizar un ensayo ELISA, se incubaron diversas proteínas de proteínas GST-GRASP55 solubles en placas de noventa y seis pocillos (Nalge Nunc International) recubiertas con glutatión. A continuación se lavaron las placas y se bloquearon con tampón que contenía PBS y el 2% de albúmina bovina durante 2 horas. Posteriormente se añadieron péptidos biotinilados que corresponden al extremo C de JAM-C con o sin el motivo de unión a PDZ. Después de tres lavados sucesivos, se añadió estreptavidina-HRP para revelar los diversos complejos, seguido por un sustrato de HRP, tetrametilbencidina (TMB). La absorbancia (DO450 nm) se determinó en un lector ELISA POLARstar. Los resultados se expresaron como media de unidades de absorbancia relativa absoluta o porcentaje de control negativo que corresponde a las señales obtenidas con GST en solitario.

10

Sistema de doble híbrido en levadura

**[0105]** Las diferentes construcciones GRASP55 se clonaron en vector pGBT9 GW (vector de fusión de dominio de unión a ADN Gal4, Trp) así como en el vector pACT2 GW (vector de fusión de dominio de activación de ADN Gal4, Leu) usando la tecnología Gateway (Invitrogen). A continuación se cotransformaron los plásmidos en cepa de levadura AH109 (/MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4/A, /gal80/A, /LYS2::GAL1//UAS//GAL1//TATA//HIS3, GAL2//UAS//GAL2//TATA//ADE2, URA3::MEL1//UAS//MEL1//TATA//lacZ, MEL1/) de acuerdo con el protocolo de transformación descrito anteriormente (Chien y col. 1991. Proc Natl Acad Sci USA. 88:9578-82). Después de la cotransformación con los dos vectores que contenían las diferentes construcciones (así como el vector vacío para probar la autoactivación), se sembraron en placa las levaduras en medio Completo Sintético (SC) menos Leucina (-L), menos Triptófano (-W), menos Histidina (-H) y se incubó a 30°C durante 4 a 5 días. Todos los medios de levadura se prepararon tal como se describe anteriormente.

Ensayo ELISA para medir la JAM-C soluble en cultivo celular sobrenadante

25

**[0106]** Se diseñó un ELISA para determinar la concentración de JAM-C soluble en sobrenadantes de cultivo celular. Se recubrieron placas de noventa y seis pocillos (Nalge Nunc International) durante toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpo JAM-C H36 anti-ratón de rata (preparación propia). Se lavaron las placas y se bloquearon con tampón que contenía PBS y el 2% de albúmina bovina durante 2 horas. Se incubaron los sobrenadantes de cultivo celular de diferentes condiciones celulares durante 3 horas. Se lavaron las placas, y se añadió anti-JAM-C de conejo policlonal (501) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados, se puso anticuerpo HRP anti-conejo de asno. Para revelar la lectura final, se añade el sustrato de HRP, tetrametilbencidina (TBS). La lectura de absorbancia (D.O a 450 nm) se realiza en un lector ELISA POLARstar.

35 Ensayo de curación de heridas

**[0107]** Para ensayos *in vitro* de curación de heridas, se cultivaron monocapas confluentes al 80% de células B16F10 de tipo silvestre o células B16F10 transfectadas con diversos ARNip o ARNhc en cámaras de insertos de cultivo Ibidi con huecos sin células definidos. Se sometieron las células a agotamiento sérico durante 24 h, antes de que se crearan las heridas por eliminación de insertos de cultivo Ibidi que definen huecos celulares de 400 µm. La curación de heridas se realizó durante 8 h en medio DMEM completo y se registró en diversos momentos después de las heridas. El análisis de cierre de heridas se realizó usando el software Metamorph y se expresa como velocidad media por minuto.

45 qRT-PCR

**[0108]** Se extrajo ARN total de las células usando el kit RNeasy (Qiagen). Se obtuvo ADNc de 1 µg de ARN total empleando oligo(dT) y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). Se realizó el análisis qRT-PCR usando SYBR Green (Applied Biosystem) y los cebadores designados. Tras 10 min de activación enzimática inicial a 95°C se realizaron 40 ciclos a 95°C durante 15 seg y a 60°C durante 1 min. Se llevó a cabo una extensión final de 10 min a 72°C. Los cebadores de oligonucleótido se diseñaron para JAM-C de ratón (directo: 5' tgt gag gtc gtt gct cta aat ga 3' (SEQ ID NO: 14); inverso: 5' cac tgg ctt cac ttg cac aat t 3' (SEQ ID NO: 15)), Grasp55 de ratón (directo: 5' TCG GTT TGC CAG AGC TCG 3' (SEQ ID NO: 16); inverso: 5' ggg aat gac ggg agg aag tc 3' (SEQ ID NO: 17)) y ratón HPRT (directo: 5' ggccctctgtgtgctcaag 3' (SEQ ID NO: 18); inverso: 5' ctgataaaatctacagtcataaggaatgga 3' (SEQ ID NO: 19)). Se usó el valor umbral de ciclo medio (CT) de medidas de HPRT en un experimento qRT-PCR para normalizar los genes ensayados. Los valores de CT medios se determinaron realizando al menos medidas de qRT-PCR por triplicado para cada gen en cada condición experimental.

ARNip y ARNhc contra GRASP55

**[0109]** Las secuencias de ARNip usadas para nuestro estudio son las siguientes:

- siGRASP55#01 (ARNip ID: s88628, 5'CGUCAUGAAUGAGUCUGAATT 3') (SEQ ID NO: 6);
  - 5 - siGRASP55#1 (ARNip ID: s88629, 5'AAGUGAUCACACCAAATT 3') (SEQ ID NO: 7);
  - siGRASP55#2 (ARNip ID: s88630, 5' CGGUUCAAGAUUAAAUAATT 3') (SEQ ID NO: 8);
  - siGRASP55#3 (ARNip ID: J-063639-09, 5'GCAUCUCUAUUACGGUUUA 3') (SEQ ID NO: 9);
  - siGRASP55#4 (ARNip ID: J-063639-10, 5' UGUAGCUACUUAACGGUAU 3') (SEQ ID NO: 10);
- 10 sicontrol siGRASP55 #01, #1 y #2 se adquirieron en Ambion mientras que sicontrol siGRASP55 #3 y #4 procedían de Dharmacon.

**[0110]** Para construir el vector pSuper.retro.ARNhcGRASP55, se diseñó un par de oligonucleótidos (directos e inversos) que contenían la secuencia diana ARNi de 19 nt obtenida del transcrito de ARNm de GRASP55 de ratón.

- 15 El oligonucleótido directo incluía un sitio de restricción BglIII en el extremo 5'; la secuencia diana de ARNi de 21 nt (SEQ ID NO: 11) en orientaciones de sentido directo y antisentido separadas por una secuencia separadora de 9 nt se diseñó para generar una horquilla. El oligonucleótido incluido en un sitio de restricción HindIII en el extremo 5'. (directo: 5' GATCCCCCGGTTCAAGATTAATAAATTTTCAAGAGAAATTTATTTAATCTTGAACCGT TTTTGGAAA 3' (SEQ ID NO: 11); ID NO: 20); inverso: 5' AGCTTTTCCAAAAACGGTTCAAGATTAATAAATTTCTCTTGAAAAATTTATTTAATCTTG AAC CGGG 3' (SEQ ID NO: 21)). A continuación se hibridaron dos oligonucleótidos y se insertaron en el plásmido pSUPER.retro linealizado. Esta mezcla de oligonucleótidos se incubó a 90°C durante 4 min y después a 70°C durante 10 min, se enfrió lentamente a 37°C durante 20 min y se almacenó a -20°C. Los oligonucleótidos hibridados se ligaron con el plásmido pSUPER.retro linealizado y se transformó en las bacterias. Los clones bacterianos se analizaron por perfil
- 25 de restricción y se secuenciaron en relación con la presencia de secuencia de ARNhc contra GRASP55.

Citometría de flujo

- [0111]** Las células B16F10 ( $1 \times 10^5$ ) se marcaron con dilución 1/1.000 de sobrenadante de anticuerpo policlonal anti-JAM-C 501 (preparación propia), o 1 µg/ml de AMc anti-Jam-C, o control de correspondencia con el isotipo en PBS frío y FCS al 0,2%. Después de lavado con PBS, se incubaron las células con FITC anti-conejo de rata o PE anti-rata de asno (Jackson Immunoresearch) y se fijaron durante 10 min en hielo en presencia de paraformaldehído al 1%. El análisis FACS se llevó a cabo en un dispositivo FACS-Scan.

35 Análisis estadístico

**[0112]** Se analizaron todos los datos en cuanto a significación estadística usando software GraphPad Prism y prueba *t* de Student.

40 Experimentos *in vivo*

- [0113]** Se usaron ratones C57BL/6 (15 semanas de vida) (Charles River Laboratories, L'Arbresle, Francia) como receptores singénicos inmunocompetentes para ensayo de metástasis de B16F10. La línea celular de melanoma tumoral B16F10 con alta capacidad de metastatizar en el pulmón se obtuvo a través de ATCC. Las
- 45 células cultivadas en cultivo tisular se sometieron a tripsinización, se lavaron y se resuspendieron en suero salino. Se inyectaron por vía intravenosa, en la vena retroorbitaria de ratones ( $1 \times 10^5$  células en 100 µl) para producir metástasis pulmonar experimental. Se sacrificó a los ratones después de 14 días, se inundaron los pulmones con sangre, se aislaron y se examinó la presencia de focos establecidos de metástasis macroscópica en los cinco lóbulos. Se usaron tres grupos de ratones ( $n = 5$ ) para tres clones de B16F10 con diferente expresión de proteína
- 50 GRASP55.

## EJEMPLO 2: Grasp55 es un compañero de unión de las JAM

- [0114]** Los autores de la invención han desarrollado una estrategia proteómica para identificar ligantes
- 55 proteínicos específicos de dominios citoplásmicos JAM-B y JAM-C por medio de planteamientos de afinidad peptídica en solución. La inmunoprecipitación de lisados celulares de carcinoma pulmonar (KLN205) se realizó usando péptidos biotinilados que corresponden a los últimos 19 aminoácidos de JAM-B y JAM-C, que cubren los motivos de unión de PDZ presentes en sus extremos C. Como control, se usaron los mismos péptidos, aunque se suprimieron los tres últimos aminoácidos conocidos como motivo de unión PDZ funcional de miembros de la familia

JAM.

**[0115]** Además de los compañeros de unión ZO-1 y ZO-2 de JAM-B y JAM-C, los autores de la invención encontraron inesperadamente otro compañero de unión, Grasp55. Esta proteína se encontró mediante espectrometría de masas, en la pista de proteínas que corresponde a la afinidad en solución realizada con el péptido JAM-B, pero no con el péptido de control JAM-B.

**[0116]** Para explorar la relevancia fisiológica de la interacción de Grasp55 con receptores de la superficie celular, los autores de la invención realizaron experimentos de coimmunoprecipitación usando anticuerpos dirigidos contra JAM-A, JAM-B, JAM-C y CD146. Se encontró una asociación entre las cuatro moléculas de adhesión con Grasp55 (Fig. 1).

**[0117]** Para explorar adicionalmente si la interacción se produjo de forma directa o indirecta, JAM-B y JAM-C se usaron como ejemplos prototípicos, y se realizaron ensayos peptídicos de afinidad en solución. En esta configuración experimental, la secuencia de péptidos que corresponde a los últimos 19 aminoácidos de JAM-B y JAM-C se usó para lisados celulares de afinidad en solución. Se encontró que Grasp55 se inmunoprecipitaba con el péptido mientras que la secuencia que carecía de los tres últimos aminoácidos de JAM-B y JAM-C era incapaz de inmunoprecipitación de Grasp55 (Fig. 1).

**[0118]** Estos resultados indican que las moléculas de adhesión de la superficie celular están asociadas endógenamente con Grasp55 en líneas celulares tumorales y endoteliales y que la interacción está mediada por la interacción directa demostrada por afinidad peptídica en solución usando JAM-B o JAM-C.

**[0119]** Para refinar y extender aún más sus observaciones, los autores de la invención usaron a continuación la técnica de doble híbrido en levadura para identificar las secuencias críticas necesarias y suficientes para soportar la interacción de JAM-A, JAM-B y JAM-C con Grasp55. Los autores de la invención encontraron que la delección de los tres últimos aminoácidos de secuencias de JAM-A, JAM-B o JAM-C suprimieron la interacción (Fig. 2) lo que indicaba un modo similar de interacción de proteínas para los tres miembros de la familia. Por otra parte, era necesaria una secuencia mínima que codificara los dominios PDZ I y II de Grasp55 para sostener la interacción mientras que una construcción que contenía sólo el primer dominio PDZ de Grasp55 era incapaz de interactuar. Los resultados combinados obtenidos por doble híbrido en levadura y afinidad peptídica en solución permiten concluir que las secuencias mínimas necesarias para obtener la interacción entre Grasp y los miembros de la familia JAM corresponden a:

- 35 - aminoácidos 1 a 160 de Grasp55 murina
- aminoácidos 260 a 299 de JAM-A murina
- aminoácidos 258 a 298 de JAM-B murina
- aminoácidos 263 a 310 de JAM-C murina.

#### 40 **EJEMPLO 3: El silenciamiento Grasp55 afecta a la expresión de moléculas de adhesión**

**[0120]** Dado que Grasp55 se ha relacionado anteriormente con el tráfico vesicular y el transporte de proteínas, los autores de la invención conjeturaron que la expresión del silenciamiento de Grasp55 puede producir una alteración en la expresión de moléculas de adhesión tales como JAM-C, lo que regula a su vez la adhesión celular, la migración celular, la inflamación, el crecimiento tumoral y la angiogénesis.

**[0121]** Se ha demostrado que el silenciamiento de la expresión GRASP55, por medio de varios ARNip reduce la estabilidad de la proteína JAM-C en la línea de células de melanoma de ratón B16F10 (Fig. 3). Esto se acompañaba de una disminución en la expresión de JAM-C de superficie celular (Fig. 4). Además se observó un descenso en la liberación de JAM-C soluble en células B16F10 silenciadas para expresión de Grasp55 por ARNhc (Fig. 5).

**[0122]** Para extender la observación de los autores de la invención a un modelo celular diferente, se realizaron experimentos similares en células endoteliales de ratón primarias (LMEC). También se observó una expresión reducida de superficie celular de JAM-C tras el silenciamiento de Grasp55 en células LMEC (Fig. 6).

**[0123]** Estos datos proporcionan la primera demostración de que la alteración de la expresión de Grasp55 afecta a la expresión de moléculas de adhesión usando el miembro prototípico de la familia JAM, JAM-C, y con la máxima probabilidad la función biológica asociada a la expresión de JAM-C.

**[0124]** Para reforzar aún más este hallazgo, se llevaron a cabo ensayos de migración usando células B16F10, para las que se sabe que la migración está correlacionada con la expresión de JAM-C. Se observó una reducción de la migración celular cuando células carecían de la expresión de Grasp55 (debido al uso de un ARNip o un ARNhc) (Fig. 7). Esto indica que Grasp55 controla directamente la migración celular y constituyen una nueva diana para planteamientos terapéuticos dirigidos a degradar la migración celular.

**EJEMPLO 4: El silenciamiento Grasp55 afecta al desarrollo de metástasis pulmonar *in vivo***

10 **[0125]** Dado el hallazgo de que las líneas celulares de melanoma B16F10 silenciadas para la expresión de GRASP55 muestran una reducción de la migración en ensayos de curación de heridas pero no se ven afectadas en su crecimiento, se investigó si el silenciamiento de Grasp55 influye en el desarrollo de metástasis pulmonar.

15 **[0126]** Para este fin, se usaron células B16F10 de las que se sabe que tienen un alto potencial de metástasis en el pulmón y se silenciaron para expresión de Grasp55 por medio de expresión de ARNhc. Se inyectaron en los ratones r.o. dos clones de B16F10 que expresan niveles reducidos de proteína GRASP55 (shG55/1 y shG55/2) en comparación con células de control. Después de 14 días, se sacrificó a los ratones y se aislaron los pulmones.

20 **[0127]** El número y el tamaño de la metástasis pulmonar que aparece como puntos negros se redujo significativamente en los grupos de ratones a los que se inocularon células B16F10 silenciadas para expresión de Grasp55 (Fig. 11). De forma interesante, se observó una correlación directa entre silenciamiento de Grasp55 y potencial metastásico. Las células shG55/1 que carecen de niveles detectables de Grasp55 produjeron sólo dos metástasis macroscópicas en cinco animales, mientras que shG55/2, en las que existe expresión residual de Grasp55, mostraron sólo una reducción en el número y el tamaño de las metástasis en comparación con las células  
25 de control.

**[0128]** Esto indica que la capacidad de desarrollo de metástasis pulmonar B16F10 está correlacionada directamente con el nivel de expresión de proteína GRASP55 en células tumorales.

30 **EJEMPLO 5: Ensayo de detección selectiva para identificar antagonistas de Grasp55**

**[0129]** Para proporcionar un procedimiento para detección selectiva de compuestos que se dirige a la actividad de Grasp55, se diseñó un ensayo ELISA que permite medir la interacción entre Grasp55 y sus compañeros de unión.  
35

**[0130]** En un primer planteamiento, se usaron secuencias peptídicas de extremo C de JAM-C y Grasp55 recombinante que corresponde a los dominios PDZ I y PDZ I+II. La secuencia peptídica en el extremo C de JAM-C que corresponde a los aminoácidos 291-310 interaccionó con PDZ I+II de Grasp55, mientras que la delección de PDZII de Grasp55 o la delección de los tres últimos aminoácidos (309-310) de JAM-C suprimió la interacción (Fig. 8).  
40

**[0131]** Los resultados ya obtenidos por doble híbrido en levadura (Fig. 2) indican que se predice que las secuencias de péptidos que contienen la secuencia de consenso de los tres últimos aminoácidos en el contexto de los residuos conservados encontrados en JAM-A, JAM-B y JAM-C interaccionan con Grasp55 (Fig. 9, panel superior). Estas secuencias están contenidas completamente en ortólogos humanos (Fig. 9, panel inferior), lo que proporciona un ensayo para detección selectiva de pequeños compuestos que degradan la interacción entre Grasp55 y moléculas de adhesión de superficie celular en seres humanos.  
45

**EJEMPLO 6: Cartografía refinada de las interacciones de Grasp55**

50 **[0132]** En el ejemplo 2, los autores de la invención han mostrado anteriormente que la interacción entre Grasp55 y la parte en el extremo C de JAM-C requiere la secuencia peptídica entre los residuos 1 a 160 de Grasp55 (PDZI+II) pero no puede producirse con los residuos 1 a 79 de Grasp55 (PDZI) por doble híbrido en levadura y ensayo ELISA (Fig. 2 y 8). En el presente ejemplo, los sitios de interacción entre JAM o metaloproteinasas implicados en la regulación de JAM y Grasp55 se han cartografiado usando nuevas construcciones. Para este fin, se ha generado un doble híbrido en levadura y proteínas de fusión GST que comprenden los residuos 1 a 107, 108 a 208 y 1 a 208 que corresponden respectivamente a las construcciones PDZI', PDZII' y PDZI'+II'. La primera construcción PDZII (residuos 80 a 160) se ha usado también para probar la interacción con las secuencias en el extremo C de ADAM 10 (de la secuencia SEQ ID NO: 41) y ADAM 17 (de la secuencia SEQ ID NO: 42) que, según se sabe, regulan la liberación de JAM-A y JAM-C (Tabla 1). Se produjeron proteínas de fusión GST y se realizó un  
55

ensayo de doble híbrido en levadura tal como se describe anteriormente en el ejemplo 1.

La Tabla I presenta las interacciones medidas usando tecnología de doble híbrido en levadura. Los símbolos "+++" y "-" indican el crecimiento de levadura en medios selectivos tal como se muestra en la Figura 13, NP indica que la interacción no ha sido probada.

|                   | JAM-C | JAM-C<br>ΔPDZbm | JAM-A | JAM-A<br>ΔPDZbm | JAM-B | JAM-B<br>ΔPDZbm | ADAM10 | ADAM17 |
|-------------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|--------|--------|
| Grasp55 FL        | +++   | -               | +++   | -               | +++   | -               | -      | -      |
| PDZI (1-79)       | -     | -               | -     | -               | -     | -               | -      | -      |
| PDZI' (1-107)     | +++   | -               | NP    | NP              | NP    | NP              | -      | -      |
| PDZII (80-160)    | -     | -               | -     | -               | -     | -               | +++    | +++    |
| PDZII' (108-208)  | -     | -               | NP    | NP              | NP    | NP              | -      | -      |
| PDZI+II (1-160)   | +++   | -               | +++   | -               | +++   | -               | -      | -      |
| PDZI'+II' (1-208) | +++   | -               | NP    | NP              | NP    | NP              | -      | -      |

**[0133]** Los resultados (Tabla 1) indican que la secuencia 1 a 107 de Grasp55 es la región mínima de Grasp55 requerida para la interacción con la región del extremo C de JAM-C. Dado que las regiones de consenso mínimas mostradas en el ejemplo 5 (SEQ ID NO: 32, 33, 34) sugieren que JAM-A y JAM-B mostrarán muy probablemente un patrón de interacción similar a JAM-C, no se han probado en este ensayo. Finalmente, se cartografió la región mínima de Grasp55 requerida para la interacción con las partes citoplásmicas del extremo C de las metaloproteinasas ADAM10 y 17 responsables de la liberación de JAM-A y JAM-C. Una región que comprende la secuencia de aminoácidos 80 a 160 de Grasp55 fue capaz de interactuar con ADAM10 y 17 lo que indica que la unión de las JAM y las ADAM para Grasp55 puede producirse simultáneamente dado que las regiones de Grasp55 necesarias para las interacciones respectivas se superponían sólo parcialmente.

#### EJEMPLO 7 Medida de HTRF de la interacción de los péptidos JAM del extremo C con dominios GST-PDZ de Grasp55

**[0134]** Para refinar y extender los resultados obtenidos por doble híbrido en levadura, se ha configurado un ensayo de fluorescencia con resolución en tiempo homogénea (HTRF) para medir las interacciones de distintos péptidos con proteínas GST recombinantes que corresponden a diferentes regiones de Grasp55. La tecnología (Cisbio, <http://www.htrf.com/splash.asp>) se asemeja al ensayo ELISA, pero no necesita etapas de lavado y se basa en señales FRET de proximidad entre el donante que se une a la fracción de Grasp55 (anticuerpo anti-GST) y el aceptor (estreptavidina-d2) que se une al péptido biotinilado.

**[0135]** Brevemente, la técnica consistió en la incubación durante 18 h a 4°C de los péptidos en el extremo C biotinilados (SEQ ID NO: 26 a 34) a la concentración de  $1,9 \times 10^{-7}$  M con la proteína de fusión GST, el anticuerpo anti-GST acoplado a terbio ( $8 \times 10^{-10}$  M cada uno) y la estreptavidina acoplada a d2 ( $4 \times 10^{-8}$  M) (los dos de Cisbio), en 0,1 mL de Hepes 0,05 M, NaCl 0,15 M BSA al 0,1%, pH 7,2. En algunos experimentos, se añadieron péptidos o agentes químicos en competencia a la mezcla de incubación para la concentración indicada. Después de la incubación, se tomaron placas de microvaloración (Costar #3693) usando PolarScan Omega (BMG Labtech) equipado para medidas de HTRF. Tras la excitación a 320 nm, se produjo una emisión de fluorescencia de 620 nm por el donante terbio que a su vez excita una emisión luminosa de 665 nm por una estreptavidina-d2 (aceptor) unida al péptido biotinilado de interacción si este último interacciona con el donante. Se obtiene la relación A665/A663 R y se calcula una Delta F como:  $[(R_{\text{muestra}} - R_{\text{FNE}}) / R_{\text{FNE}}] * 100$  en la que  $R_{\text{FNE}}$  es la señal de fondo no específica determinada en incubados en los que se omisión la proteína de fusión GST.

**[0136]** Usando esta técnica, se han confirmado las interacciones de péptidos JAM-A, JAM-B y JAM-C con las construcciones GST PDZI' y PDZI'+II', mientras que la interacción de CD146 sólo se detectó con la construcción GST PDZI' (Fig. 12). En consecuencia, las secuencias de aminoácidos 1 a 107 de Grasp55 se requiere mínimamente para la interacción con JAM-A, JAM-B, JAM-C y CD146, mientras que el dominio PDZ2 de Grasp55 en el péptido PDZII' (región 108-208) limita la interacción de Grasp55 con los miembros de la familia JAM. El péptido biotinilado de control PDZbm (Fig. 9, SEQ ID NO: 31) no produjo señal con respecto al fondo, lo que indica que los tres aminoácidos hidrófobos terminales de JAM-C son necesarios para la interacción con los dominios PDZ de Grasp55.

**[0137]** Con el fin de definir y validar mejor esta tecnología de rendimiento semialto para medidas de

interacción, se ha usado un péptido no biotinilado que corresponde a JAM-C (SEQ ID NO: 30, Fig. 9) para inhibir la interacción entre JAM-C y Grasp55. Los resultados se expresan como Delta F/Delta F0 en los que Delta F0 corresponde a la señal en ausencia de péptido en competencia y proporcionan una visión de la constante de afinidad aparente ( $A_{pp}Aff$ ) de la unión de JAM-C con los dominios PDZ Grasp PDZ. Tal como se muestra en la Figura 5 13, el péptido no marcado compite con la señal HTRF con EC50 en el intervalo micromolar bajo para GST-PDZI'+II' y GST-GraspFL (GST-Grasp55 de longitud completa) mientras que se observa un aumento de veinte veces en EC50 cuando se usa la construcción GST-PDZI'. Esto indica que la afinidad de la interacción de JAM-C con Grasp55 mejora enormemente por la presencia del dominio PDZ2 de Grasp55 (péptido PDZII') y que los antagonistas que inhiben la interacción Grasp55/JAM-C deberían seleccionarse más preferentemente por su capacidad para interferir 10 con la interacción GST PDZI'+ II'/JAM-C.

#### **EJEMPLO 8 Medida de HTRF de la interacción de los péptidos JAM en el extremo C con dominios GST-PDZ de Grasp55**

15 **[0138]** La medida de HTRF se ha usado además usando péptido JAM-C no marcado para determinar la afinidad relativa de péptidos JAM-A, JAM-B y CD146 para las proteínas recombinantes GST-PDZI' y GST-PDZI'+II' (Fig. 14). Los resultados indican que la  $A_{pp}Aff$  de JAM-C es igual a la  $A_{pp}Aff$  de JAM-A, mayor que la  $A_{pp}Aff$  de CD146 y menor que la  $A_{pp}Aff$  de JAM-B. Además, los datos indican que la JAM-B interacciona igualmente con las proteínas recombinantes GST-PDZI' y GST-PDZI'+II', mientras que JAM-A y JAM-C muestra una  $A_{pp}Aff$  superior para proteína 20 recombinante GST-PDZI'+II' que para GST-PDZI'. Asimismo, estos resultados muestran que este ensayo permite la identificación de interacciones soportadas por antagonistas de Grasp55. La inhibición de la interacción de JAM-A, CD146 y JAM-B por péptido no marcado JAM-C aporta la prueba de concepto de que existen antagonistas naturales y que la estequiometría relativa de asociación de Grasp55 con JAM-A, JAM-B, JAM-C y CD146 puede basarse en la afinidad relativa de las interacciones con Grasp de longitud completa, polipéptido PDZI' (dominio PDZ1) o polipéptido 25 PDZI'+II' (dominios PDZ1 y PDZ2 dominios).

#### **EJEMPLO 9 Detección selectiva de biblioteca NINDS para inhibidores de interacción Grasp55 con JAM-C**

**[0139]** Se ha demostrado que la medida de HTRF de interacción es una tecnología fiable para identificar los 30 inhibidores de la interacción. Se ha iniciado una detección selectiva de una biblioteca de compuestos químicos proporcionada por MRCT. La detección selectiva consistía en la misma técnica HTRF utilizada en el Ejemplo 7 con la salvedad de que los compuestos de la biblioteca se añadieron en la mezcla de incubación a la concentración final de  $6,6 \times 10^{-5}$  M. De los 1.040 compuestos proporcionados por la biblioteca NINDS, sólo veinte compuestos redujeron la señal Delta F usando las construcciones GST-PDZI' o GST-PDZI'+II' y JAM-C biotinilada (datos en la Fig. 15 35 mostrados sólo para disulfiram, carboplatino y ácido eláxico). En particular, la mayoría de los compuestos inhibieron las señales obtenidas con construcciones Grasp55 recombinantes GST-PDZI' y GST-PDZI'+II'. Dado que dicho resultado pudo deberse a una inhibición específica de la interacción del péptido JAM-C con los dominios PDZ de Grasp55 recombinante o con una inhibición no específica de la señal FRET entre donador y aceptor en tecnología HTRF, los veinte compuestos seleccionados se han probado adicionalmente. De hecho, los compuestos podrían 40 interferir potencialmente con la unión del anticuerpo anti-GST marcado con terbio con la GST de la proteína de fusión, la unión de estreptavidina-d2 con el péptido biotinilado o promover una intensa interferencia en 320, 630 ó 665 nm. Así, los posibles impactos obtenidos se sometieron a detección selectiva de inhibición no específica. Para este fin, se sometió la proteína recombinante GSTPDZI'+ II' a biotinilación usando Sulfo-NHS Biotina según las instrucciones del fabricante (Pierce). Esto permite el diseño de un ensayo de HTRF en el que la estreptavidina 45 acoplada a d2 (aceptor) y el anticuerpo anti-GST acoplado a terbio están unidos directamente a la proteína recombinante GST-PDZI'+II' y producen señal Delta F independientemente del péptido biotinilado. Los veinte compuestos seleccionados fueron así probados en este ensayo para eliminar aquellos que proporcionaban una falsa inhibición de las señales de HTRF mientras que los inhibidores de la interacción de péptidos biotinilados con GST-PDZI'+II' no debería interferir en este ensayo.

50 **[0140]** Los resultados muestran que sólo doce compuestos no redujeron significativamente las señales de control por debajo del 80% de la señal de control, entre los cuales sólo el disulfiram (1,1',1",1'''-[disulfanodiiibis(carbonotioilnitrilo)]tetraetano), el carboplatino (cis-diamina(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platino (II)) y el ácido eláxico (2,3,7,8-tetrahidroxi-cromeno[5,4,3-cde]cromeno-5,10-diona) redujeron las señales obtenidas con 55 GST-PDZI' o GST-PDZI'+II' y péptido JAM-C biotinilado para más del 40% (Fig. 16, barras negras). En consecuencia, estos tres compuestos son nuevos antagonistas de la interacción JAM C/Grasp55 y pueden usarse como antagonista de compañeros de Grasp55 que interaccionan con dominios PDZ y en particular péptido PDZI' para carboplatino, péptido PDZI'+II' para disulfiram y los dos péptidos para ácido eláxico.

**EJEMPLO 10: Grasp55 controla las respuestas de JAM-A y JAM-C a la estimulación inflamatoria**

**[0141]** Numerosos estudios han demostrado que la expresión y la liberación de moléculas de adhesión por células endoteliales están reguladas por inflamación. En el caso de JAM-A y JAM-C, se ha demostrado que las metaloproteinasas de desintegrina ADAM10 y ADAM17 son responsables de la liberación regulada de moléculas solubles tras la estimulación con TNF- $\alpha$  o TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  de células endoteliales (Koenen, Blood 2009; Rabquer BJ, Journal Immunol, 2010; Hou y Rabquer Ann Rheu Dis, 2010). Una vez demostrado que Grasp55 interacciona con los dominios citoplásmicos en el extremo C JAM-A, JAM-C, ADAM10 y ADAM17 (véase Tabla 1), se han ensayado los efectos de inhibición de la expresión de Grasp55 en la liberación de JAM-A y JAM-C tras la estimulación con TNF- $\alpha$  o TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  de células endoteliales.

*Células, transfección y anticuerpos*

**[0142]** Las células HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana) se cultivan en un soporte cubierto con gelatina al 0,1% en un medio para células endoteliales (PromoCell) complementado por suero de ternera fetal (2%), factor de crecimiento epidérmico (5 ng/ml), factor de crecimiento fibroblástico (10 ng/ml), factor de crecimiento "de tipo insulina" (20 ng/ml), factor de crecimiento vascular (0,5 ng/ml), ácido ascórbico (1  $\mu$ g/ml), heparina (22,5  $\mu$ g/ml) e hidrocortisona (0,2  $\mu$ g/ml). Las células HUVEC ( $1 \times 10^6$ ) son transfectadas por el sistema Amaxa (Amaxa Old Nucleofactor kit, Lonza) con dos ARNip dirigidos contra GORASP2 humano (Silencer Select siARN, Ambion); s24914 (5'CUAUUACACCUCUUAAAAGAtt3'); s24915 (5'GAGUCUGACUGGACUUUCUtt3') y ARNip de control (Thermo Scientific Dharmacon). Los anticuerpos JAM-A y JAM-C anti-humanos, control isotópico y proteínas JAM-A y JAM-C solubles recombinantes humanas fueron proporcionados por R&D systems. Se usaron anticuerpos monoclonal Grasp55 de ratón anti-humano (Abnova), policlonal de conejo JAM-C anti-humano (R&D), policlonal de conejo JAM-C anti-humana (preparación propia), monoclonal de ratón JAM-A anti-humano (preparación propia) y JAM-A de cabra anti-humano (R&D).

**[0143]** *Ensayo ELISA*

**[0144]** Con el fin de estudiar la liberación de formas solubles de JAM-A y JAM-C, se estimularon las células HUVEC con citocinas proinflamatorias. Cuatro horas antes de la estimulación, el medio se sustituye por medio sin suero y después se estimulan las HUVEC por TNF $\alpha$  (200 ng/ml) o TNF $\alpha$  e interferón- $\gamma$  (200 ng/ml + 200 U/ml). Se recogen los sobrenadantes de los cultivos celulares después de veinticuatro horas de estimulación y después se centrifugan a 11.000 g. La concentración de JAM-A y JAM-C solubles en los sobrenadantes se determina por ensayo ELISA. Las placas ELISA (placas de 96 pocillos, MaxiSorp, Nunc) se incuban durante toda la noche a 4°C con 3  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-JAM-A o anti-JAM-C diluido en PBS 1X, pH 7,2. Se lavan cinco veces con PBS 1X/Tween al 0,05%, después se saturan durante dos horas con PBS 1X/BSA al 2% y se incuban durante dos horas con los sobrenadantes y soluciones de curvas estándar de proteínas JAM-A y JAM-C solubles recombinantes (1  $\mu$ g/ml a 0,01 pg/ml) a 4°C. A continuación se lavan las placas y se incuban con anticuerpos JAM-A y JAM-C antihumanos (PBS 1X/BSA al 0,5%) durante una hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se añaden los anticuerpos HRP anti-cabra y HRP anti-conejo diluidos en PBS 1X/BSA al 0,5% durante una hora a temperatura ambiente. Al final del ensayo, se lavan las placas y después se incuban con tetrametilbencidina (R&D systems). La reacción enzimática se interrumpe con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. La densidad óptica se mide a 450 nm con POLARstar OMEGA (BMG LABTECH).

45 *Resultados*

**[0145]** Usando dos ARNip diferentes contra Grasp55 en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), se ha encontrado que se suprime la liberación de JAM-A y JAM-C solubles tras la estimulación con TNF- $\alpha$  o TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (Fig. 17). Esto es probable debido al desensamblaje de un complejo de proteínas que contiene Grasp55, ADAM10, ADAM17 y las moléculas de adhesión que interaccionan con Grasp55 que han sido identificadas. Estos resultados indican que JAM-A y JAM-C pueden usarse para determinar si un compuesto es capaz de inhibir Grasp55 midiendo el nivel de liberación de JAM-A y JAM-C solubles.

## LISTADO DE SECUENCIAS

55

**[0146]**

&lt;110&gt; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

ES 2 605 808 T3

<120> ANTAGONISTAS DE GRASP55 PARA SU USO COMO UN MEDICAMENTO

<130> BET 12P0084

5

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 451

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 1

```

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

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

Leu Glu Pro Phe Phe Asp Phe Ile Val Ser Ile Asn Gly Ser Arg Leu
          35           40           45

Asn Lys Asp Asn Asp Thr Leu Lys Asp Leu Leu Lys Ala Asn Val Glu
 50           55           60

Lys Pro Val Lys Met Leu Ile Tyr Ser Ser Lys Thr Leu Glu Leu Arg
 65           70           75           80

Glu Ala Ser Val Thr Pro Ser Asn Leu Trp Gly Gly Gln Gly Leu Leu
          85           90           95

Gly Val Ser Ile Arg Phe Cys Ser Phe Asp Gly Ala Asn Glu Asn Val
          100          105          110

Trp His Val Leu Glu Val Glu Ser Asn Ser Pro Ala Ala Leu Ala Gly
          115          120          125

Leu Arg Pro His Ser Asp Tyr Ile Ile Gly Ala Asp Thr Val Met Asn
          130          135          140

Glu Ser Glu Asp Leu Phe Ser Leu Ile Glu Thr His Glu Ala Lys Pro
          145          150          155          160

Leu Lys Leu Tyr Val Tyr Asn Thr Asp Thr Asp Asn Cys Arg Glu Val
          165          170          175
    
```

ES 2 605 808 T3

Ile Ile Thr Pro Asn Ser Ala Trp Gly Gly Glu Gly Ser Leu Gly Cys  
180 185 190

Gly Ile Gly Tyr Gly Tyr Leu His Arg Ile Pro Thr Arg Pro Phe Glu  
195 200 205

Glu Gly Lys Lys Ile Ser Leu Pro Gly Gln Met Thr Gly Thr Pro Ile  
210 215 220

Thr Pro Leu Lys Asp Gly Phe Thr Glu Val Gln Leu Ser Ser Val Ser  
225 230 235 240

Pro Pro Ser Leu Ser Pro Pro Gly Thr Thr Gly Val Glu Gln Ser Leu  
245 250 255

Ser Gly Leu Ser Ile Ser Ser Ala Pro Pro Ala Val Ser Asn Val Leu  
260 265 270

Ser Thr Gly Val Pro Thr Val Pro Leu Leu Pro Pro Gln Val Asn Gln  
275 280 285

Ser Leu Ala Ser Met Pro Pro Met Asn Pro Ala Thr Thr Leu Pro Ser  
290 295 300

Leu Met Pro Leu Ser Ala Gly Leu Pro Ser Leu Pro Asn Leu Pro Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Asn Phe Asn Leu Pro Ala Pro His Ile Met Pro Gly Val Gly  
325 330 335

Leu Pro Glu Leu Gly Ser Pro Gly Leu Pro Pro Leu Pro Ser Leu Pro  
340 345 350

Pro Arg Asn Leu Pro Gly Ile Ala Pro Leu Pro Met Leu Ser Asp Phe  
355 360 365

Leu Pro Ser Phe Pro Leu Val Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Ser Ala  
370 375 380

Gly Glu Pro Leu Ser Ser Leu Pro Ala Met Gly Pro Pro Ser Asp Pro  
385 390 395 400

Val Met Thr Thr Ala Lys Ala Asp Ala Ser Ser Leu Thr Val Asp Val  
405 410 415

Thr Ser Pro Ala Ser Lys Val Pro Thr Thr Val Glu Asp Arg Val Ser  
420 425 430

ES 2 605 808 T3

Asp Cys Thr Pro Ala Val Glu Lys Pro Val Ser Asp Ala Asp Ala Ser  
435 440 445

Glu Pro Ser  
450

<210> 2  
<211> 452  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 2

ES 2 605 808 T3

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

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

Leu Glu Pro Phe Phe Asp Phe Ile Val Ser Ile Asn Gly Ser Arg Leu  
 35 40 45

Asn Lys Asp Asn Asp Thr Leu Lys Asp Leu Leu Lys Ala Asn Val Glu  
 50 55 60

Lys Pro Val Lys Met Leu Ile Tyr Ser Ser Lys Thr Leu Glu Leu Arg  
 65 70 75 80

Glu Thr Ser Val Thr Pro Ser Asn Leu Trp Gly Gly Gln Gly Leu Leu  
 85 90 95

Gly Val Ser Ile Arg Phe Cys Ser Phe Asp Gly Ala Asn Glu Asn Val  
 100 105 110

Trp His Val Leu Glu Val Glu Ser Asn Ser Pro Ala Ala Leu Ala Gly  
 115 120 125

Leu Arg Pro His Ser Asp Tyr Ile Ile Gly Ala Asp Thr Val Met Asn  
 130 135 140

Glu Ser Glu Asp Leu Phe Ser Leu Ile Glu Thr His Glu Ala Lys Pro  
 145 150 155 160

Leu Lys Leu Tyr Val Tyr Asn Thr Asp Thr Asp Asn Cys Arg Glu Val  
 165 170 175

Ile Ile Thr Pro Asn Ser Ala Trp Gly Gly Glu Gly Ser Leu Gly Cys  
 180 185 190

ES 2 605 808 T3

Gly Ile Gly Tyr Gly Tyr Leu His Arg Ile Pro Thr Arg Pro Phe Glu  
 195 200 205

Glu Gly Lys Lys Ile Ser Leu Pro Gly Gln Met Ala Gly Thr Pro Ile  
 210 215 220

Thr Pro Leu Lys Asp Gly Phe Thr Glu Val Gln Leu Ser Ser Val Asn  
 225 230 235 240

Pro Pro Ser Leu Ser Pro Pro Gly Thr Thr Gly Ile Glu Gln Ser Leu  
 245 250 255

Thr Gly Leu Ser Ile Ser Ser Thr Pro Pro Ala Val Ser Ser Val Leu  
 260 265 270

Ser Thr Gly Val Pro Thr Val Pro Leu Leu Pro Pro Gln Val Asn Gln  
 275 280 285

Ser Leu Thr Ser Val Pro Pro Met Asn Pro Ala Thr Thr Leu Pro Gly  
 290 295 300

Leu Met Pro Leu Pro Ala Gly Leu Pro Asn Leu Pro Asn Leu Asn Leu  
 305 310 315 320

Asn Leu Pro Ala Pro His Ile Met Pro Gly Val Gly Leu Pro Glu Leu  
 325 330 335

Val Asn Pro Gly Leu Pro Pro Leu Pro Ser Met Pro Pro Arg Asn Leu  
 340 345 350

Pro Gly Ile Ala Pro Leu Pro Leu Pro Ser Glu Phe Leu Pro Ser Phe  
 355 360 365

Pro Leu Val Pro Glu Ser Ser Ser Ala Ala Ser Ser Gly Glu Leu Leu  
 370 375 380

Ser Ser Leu Pro Pro Thr Ser Asn Ala Pro Ser Asp Pro Ala Thr Thr  
 385 390 395 400

Thr Ala Lys Ala Asp Ala Ala Ser Ser Leu Thr Val Asp Val Thr Pro  
 405 410 415

Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Thr Val Glu Asp Arg Val Gly Asp Ser  
 420 425 430

Thr Pro Val Ser Glu Lys Pro Val Ser Ala Ala Val Asp Ala Asn Ala

# ES 2 605 808 T3

435

440

445

Ser Glu Ser Pro  
450

<210> 3  
<211> 300  
5 <212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 3

ES 2 605 808 T3

Met Gly Thr Glu Gly Lys Ala Gly Arg Lys Leu Leu Phe Leu Phe Thr  
 1 5 10 15

Ser Met Ile Leu Gly Ser Leu Val Gln Gly Lys Gly Ser Val Tyr Thr  
 20 25 30

Ala Gln Ser Asp Val Gln Val Pro Glu Asn Glu Ser Ile Lys Leu Thr  
 35 40 45

Cys Thr Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Val  
 50 55 60

Gln Gly Ser Thr Thr Ala Leu Val Cys Tyr Asn Ser Gln Ile Thr Ala  
 65 70 75 80

Pro Tyr Ala Asp Arg Val Thr Phe Ser Ser Ser Gly Ile Thr Phe Ser  
 85 90 95

Ser Val Thr Arg Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu  
 100 105 110

Glu Gly Gly Gln Asn Tyr Gly Glu Val Ser Ile His Leu Thr Val Leu  
 115 120 125

Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Ile Ser Val Pro Ser Ser Val Thr Ile  
 130 135 140

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

Ser Glu Tyr Ser Trp Phe Lys Asp Gly Ile Ser Met Leu Thr Ala Asp  
 165 170 175

Ala Lys Lys Thr Arg Ala Phe Met Asn Ser Ser Phe Thr Ile Asp Pro  
 180 185 190

Lys Ser Gly Asp Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Ala Phe Asp Ser Gly



ES 2 605 808 T3

Met Ala Arg Ser Pro Gln Gly Leu Leu Met Leu Leu Leu Leu His Tyr  
 1 5 10 15

Leu Ile Val Ala Leu Asp Tyr His Lys Ala Asn Gly Phe Ser Ala Ser  
 20 25 30

Lys Asp His Arg Gln Glu Val Thr Val Ile Glu Phe Gln Glu Ala Ile  
 35 40 45

Leu Ala Cys Lys Thr Pro Lys Lys Thr Thr Ser Ser Arg Leu Glu Trp  
 50 55 60

Lys Lys Val Gly Gln Gly Val Ser Leu Val Tyr Tyr Gln Gln Ala Leu  
 65 70 75 80

Gln Gly Asp Phe Lys Asp Arg Ala Glu Met Ile Asp Phe Asn Ile Arg  
 85 90 95

Ile Lys Asn Val Thr Arg Ser Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Cys Glu Val  
 100 105 110

Ser Ala Pro Thr Glu Gln Gly Gln Asn Leu Gln Glu Asp Lys Val Met

ES 2 605 808 T3

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

<210> 5  
 <211> 310  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 5

ES 2 605 808 T3

Met Ala Leu Ser Arg Arg Leu Arg Leu Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Pro  
1                   5                   10                   15

Asp Phe Phe Leu Leu Leu Leu Phe Arg Gly Cys Met Ile Glu Ala Val  
20                   25                   30

Asn Leu Lys Ser Ser Asn Arg Asn Pro Val Val His Glu Phe Glu Ser



# ES 2 605 808 T3

Asp Gly Val Asn Tyr Ile Arg Thr Ser Glu Glu Gly Asp Phe Arg His  
 290 295 300

Lys Ser Ser Phe Val Ile  
 305 310

<210> 6  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ARNip  
 10 <400> 6

cgucaugaau gagucugaat t 21

15 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> ARNip  
 <400> 7

25 aagugaucu cacaccaa t 21

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> ARNip

35 <400> 8

cgguucaaga uaaaauaat t 21

<210> 9  
 40 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 45 <223> ARNip  
 <400> 9

gcaucucuau uacgguua t 19  
 50 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 5 <400> 10  
 uguagcuacu uaacggau 19  
 10 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 15 <400> 11 cggttcaaga taaataaat t 21  
 <210> 12  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ARNhc (cadena en sentido directo)  
 25 <400> 12  
 cgguucaaga uaaaauaat t 21  
 30 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> ARNhc (cadena antisentido)  
 <400> 13  
 40 aattattta atctgaacc g 21  
 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 14  
 tggaggtcg ttgctctaaa tga 23  
 <210> 15  
 55 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> cebador  
 <400> 15  
 5 cactggcttc actgcacaa tt 22  
 <210> 16  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 15 <400> 16  
 tcggtttgcc agagctcg 18  
 <210> 17  
 20 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador  
 <400> 17  
 gggaatgacg ggaggaagtc 20  
 30 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 18  
 40 ggccctctgt gtgctcaag 19  
 <210> 19  
 <211> 29  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 19  
 ctgataaaat ctacagtcac aggaatgga 29  
 55 <210> 20  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

ES 2 605 808 T3

<220>

<223> cebador

<400> 20

5

gatcccccggttcaagatta aataaat ttt caagagaaat ttatttaatc ttgaaccgtt 60

tttgaaaa 68

<210> 21

<211> 68

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 21

agcttttcca aaaacgggtc aagattaaat aaatttctct tgaaaattta ttaaatcttg 60

aaccgggg 68

20 <210> 22

<211> 218

<212> PRT

<213> Schistosoma japonicum

25 <400> 22

ES 2 605 808 T3

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro  
 1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu  
 20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu  
 35 40 45

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

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn  
 65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu  
 85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser  
 100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu  
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn  
 130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp  
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu  
 165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr  
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala  
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys  
 210 215

<210> 23  
 <211> 299  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23

ES 2 605 808 T3

Met Gly Thr Lys Ala Gln Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe Ile  
 1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His  
 20 25 30

Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu  
 35 40 45

Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe  
 50 55 60

Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr  
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe  
 85 90 95

Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser  
 100 105 110

Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val  
 115 120 125

Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr  
 130 135 140

Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro  
 145 150 155 160

Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn  
 165 170 175

ES 2 605 808 T3

Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro  
 180 185 190

Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly  
 195 200 205

Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser  
 210 215 220

Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val  
 225 230 235 240

Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly  
 245 250 255

Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly  
 260 265 270

Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu  
 275 280 285

Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val  
 290 295

<210> 24  
 <211> 298  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24

ES 2 605 808 T3

Met Ala Arg Arg Ser Arg His Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Tyr  
1 5 10 15

Leu Val Val Ala Leu Gly Tyr His Lys Ala Tyr Gly Phe Ser Ala Pro  
20 25 30

Lys Asp Gln Gln Val Val Thr Ala Val Glu Tyr Gln Glu Ala Ile Leu  
35 40 45

Ala Cys Lys Thr Pro Lys Lys Thr Val Ser Ser Arg Leu Glu Trp Lys  
50 55 60

Lys Leu Gly Arg Ser Val Ser Phe Val Tyr Tyr Gln Gln Thr Leu Gln  
65 70 75 80

Gly Asp Phe Lys Asn Arg Ala Glu Met Ile Asp Phe Asn Ile Arg Ile  
85 90 95

ES 2 605 808 T3

Lys Asn Val Thr Arg Ser Asp Ala Gly Lys Tyr Arg Cys Glu Val Ser  
 100 105 110

Ala Pro Ser Glu Gln Gly Gln Asn Leu Glu Glu Asp Thr Val Thr Leu  
 115 120 125

Glu Val Leu Val Ala Pro Ala Val Pro Ser Cys Glu Val Pro Ser Ser  
 130 135 140

Ala Leu Ser Gly Thr Val Val Glu Leu Arg Cys Gln Asp Lys Glu Gly  
 145 150 155 160

Asn Pro Ala Pro Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Arg Leu Leu  
 165 170 175

Glu Asn Pro Arg Leu Gly Ser Gln Ser Thr Asn Ser Ser Tyr Thr Met  
 180 185 190

Asn Thr Lys Thr Gly Thr Leu Gln Phe Asn Thr Val Ser Lys Leu Asp  
 195 200 205

Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Ser Val Gly Tyr Arg Arg  
 210 215 220

Cys Pro Gly Lys Arg Met Gln Val Asp Asp Leu Asn Ile Ser Gly Ile  
 225 230 235 240

Ile Ala Ala Val Val Val Val Ala Leu Val Ile Ser Val Cys Gly Leu  
 245 250 255

Gly Val Cys Tyr Ala Gln Arg Lys Gly Tyr Phe Ser Lys Glu Thr Ser  
 260 265 270

Phe Gln Lys Ser Asn Ser Ser Ser Lys Ala Thr Thr Met Ser Glu Asn  
 275 280 285

Asp Phe Lys His Thr Lys Ser Phe Ile Ile  
 290 295

<210> 25  
 <211> 310  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25



ES 2 605 808 T3

Asp Phe Phe Leu Leu Leu Leu Phe Arg Gly Cys Leu Ile Gly Ala Val  
 20 25 30  
 Asn Leu Lys Ser Ser Asn Arg Thr Pro Val Val Gln Glu Phe Glu Ser  
 35 40 45  
 Val Glu Leu Ser Cys Ile Ile Thr Asp Ser Gln Thr Ser Asp Pro Arg  
 50 55 60  
 Ile Glu Trp Lys Lys Ile Gln Asp Glu Gln Thr Thr Tyr Val Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Asp Asn Lys Ile Gln Gly Asp Leu Ala Gly Arg Ala Glu Ile Leu Gly  
 85 90 95  
 Lys Thr Ser Leu Lys Ile Trp Asn Val Thr Arg Arg Asp Ser Ala Leu  
 100 105 110  
 Tyr Arg Cys Glu Val Val Ala Arg Asn Asp Arg Lys Glu Ile Asp Glu  
 115 120 125  
 Ile Val Ile Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Pro Val Thr Pro Val Cys  
 130 135 140  
 Arg Val Pro Lys Ala Val Pro Val Gly Lys Met Ala Thr Leu His Cys  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Ser Glu Gly His Pro Arg Pro His Tyr Ser Trp Tyr Arg Asn  
 165 170 175  
 Asp Val Pro Leu Pro Thr Asp Ser Arg Ala Asn Pro Arg Phe Arg Asn  
 180 185 190  
 Ser Ser Phe His Leu Asn Ser Glu Thr Gly Thr Leu Val Phe Thr Ala  
 195 200 205  
 Val His Lys Asp Asp Ser Gly Gln Tyr Tyr Cys Ile Ala Ser Asn Asp  
 210 215 220  
 Ala Gly Ser Ala Arg Cys Glu Glu Gln Glu Met Glu Val Tyr Asp Leu  
 225 230 235 240  
 Asn Ile Gly Gly Ile Ile Gly Gly Val Leu Val Val Leu Ala Val Leu  
 245 250 255  
 Ala Leu Ile Thr Leu Gly Ile Cys Cys Ala Tyr Arg Arg Gly Tyr Phe  
 260 265 270

ES 2 605 808 T3

Ile Asn Asn Lys Gln Asp Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Pro Gly Lys Pro  
275 280 285

Asp Gly Val Asn Tyr Ile Arg Thr Asp Glu Glu Gly Asp Phe Arg His  
290 295 300

Lys Ser Ser Phe Val Ile  
305 310

- <210> 26
- <211> 19
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
  
- <220>
- <223> péptido
- 10
- <400> 26

Ser Gln Pro Ser Thr Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser  
1 5 10 15

Phe Leu Val

- 15 <210> 27
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Artificial
  
- 20 <220>
- <223> péptido
  
- <400> 27

Ser Gln Pro Ser Thr Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser  
1 5 10 15

- 25
- <210> 28
- <211> 19
- <212> PRT
- 30 <213> Artificial
  
- <220>
- <223> péptido
  
- 35 <400> 28

ES 2 605 808 T3

Ser Lys Val Thr Thr Met Ser Glu Asn Asp Phe Lys His Thr Lys Ser  
1 5 10 15

Phe Ile Ile

<210> 29  
<211> 16  
5 <212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> péptido  
10  
<400> 29

Ser Lys Val Thr Thr Met Ser Glu Asn Asp Phe Lys His Thr Lys Ser  
1 5 10 15

15 <210> 30  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
20 <220>  
<223> péptido  
  
<400> 30

Asn Tyr Ile Arg Thr Ser Glu Glu Gly Asp Phe Arg His Lys Ser Ser  
1 5 10 15

Phe Val Ile

25  
  
<210> 31  
<211> 16  
<212> PRT  
30 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> péptido  
  
35 <400> 31

Asn Tyr Ile Arg Thr Ser Glu Glu Gly Asp Phe Arg His Lys Ser Ser  
1 5 10 15

<210> 32  
40 <211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 605 808 T3

<220>  
<223> consenso

<400> 32  
5

Asn Gln Pro Ser Thr Met Ser Glu Asn Asp Phe Lys Gln Thr Lys Ser  
1 5 10 15

Phe Ile Ile

<210> 33  
<211> 19  
10 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> consenso

15 <220>

<221> misc\_feature

20 <222> (5)..(5)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

<220>

25 <221> misc\_feature

<222> (8)..(8)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

30 <220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

<220>

<221> misc\_feature

40

<222> (16)..(17)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

<400> 33

45

Ser Lys Val Thr Xaa Arg Glu Xaa Gly Glu Xaa Arg His Lys Ser Xaa  
1 5 10 15

Xaa Leu Val

<210> 34  
<211> 19

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> consenso

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (1)..(1)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (5)..(5)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

20 <220>

<221> misc\_feature

25 <222> (7)..(17)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

<220>

30 <221> misc\_feature

<222> (19)..(19)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

35 <400> 34

Xaa Tyr Ile Arg Xaa Ser Xaa  
1 5 10 15

Xaa Val Xaa

<210> 35  
40 <211> 42  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

45 <223> Fragmento de JAM-A humana

<400> 35

ES 2 605 808 T3

Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu Gly  
20 25 30

Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val  
35 40

<210> 36

<211> 43

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento de JAM-A murina

10

<400> 36

Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly Tyr Phe Glu Thr Thr Lys Lys Gly Thr  
1 5 10 15

Ala Pro Gly Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Thr Arg Ser Glu  
20 25 30

Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val  
35 40

15 <210> 37

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Fragmento de JAM-B humana

<400> 37

Cys Tyr Ala Gln Arg Lys Gly Tyr Phe Ser Lys Glu Thr Ser Phe Gln  
1 5 10 15

Lys Ser Asn Ser Ser Ser Lys Ala Thr Thr Met Ser Glu Asn Asp Phe  
20 25 30

Lys His Thr Lys Ser Phe Ile Ile  
35 40

25

<210> 38

<211> 40

ES 2 605 808 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> Fragmento de JAM-B murina  
<400> 38

Cys Tyr Ala Gln Arg Lys Gly Tyr Phe Ser Lys Glu Thr Ser Phe Gln  
1 5 10 15  
Lys Gly Ser Pro Ala Ser Lys Val Thr Thr Met Ser Glu Asn Asp Phe  
20 25 30  
Lys His Thr Lys Ser Phe Ile Ile  
35 40

10  
<210> 39  
<211> 47  
<212> PRT  
<213> Artificial  
15  
<220>  
<223> Fragmento de JAM-C humana  
<400> 39  
20

Cys Cys Ala Tyr Arg Arg Gly Tyr Phe Ile Asn Asn Lys Gln Asp Gly  
1 5 10 15  
Glu Ser Tyr Lys Asn Pro Gly Lys Pro Asp Gly Val Asn Tyr Ile Arg  
20 25 30  
Thr Asp Glu Glu Gly Asp Phe Arg His Lys Ser Ser Phe Val Ile  
35 40 45

<210> 40  
<211> 47  
25 <212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> fragmento de JAM-C murina  
30  
<400> 40

ES 2 605 808 T3

Cys Cys Ala Tyr Arg Arg Gly Cys Phe Ile Ser Ser Lys Gln Asp Gly  
1 5 10 15

Glu Ser Tyr Lys Ser Pro Gly Lys His Asp Gly Val Asn Tyr Ile Arg  
20 25 30

Thr Ser Glu Glu Gly Asp Phe Arg His Lys Ser Ser Phe Val Ile  
35 40 45

<210> 41

<211> 54

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Phe Ile Lys Ile Cys Ser Val His Thr Pro Ser Ser Asn Pro Lys  
1 5 10 15

Leu Pro Pro Pro Lys Pro Leu Pro Gly Thr Leu Lys Arg Arg Arg Pro  
20 25 30

Pro Gln Pro Ile Gln Gln Pro Pro Arg Gln Arg Pro Arg Glu Tyr Gln  
35 40 45

Met Gly His Met Arg Arg  
50

10

<210> 42

<211> 135

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 42

ES 2 605 808 T3

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

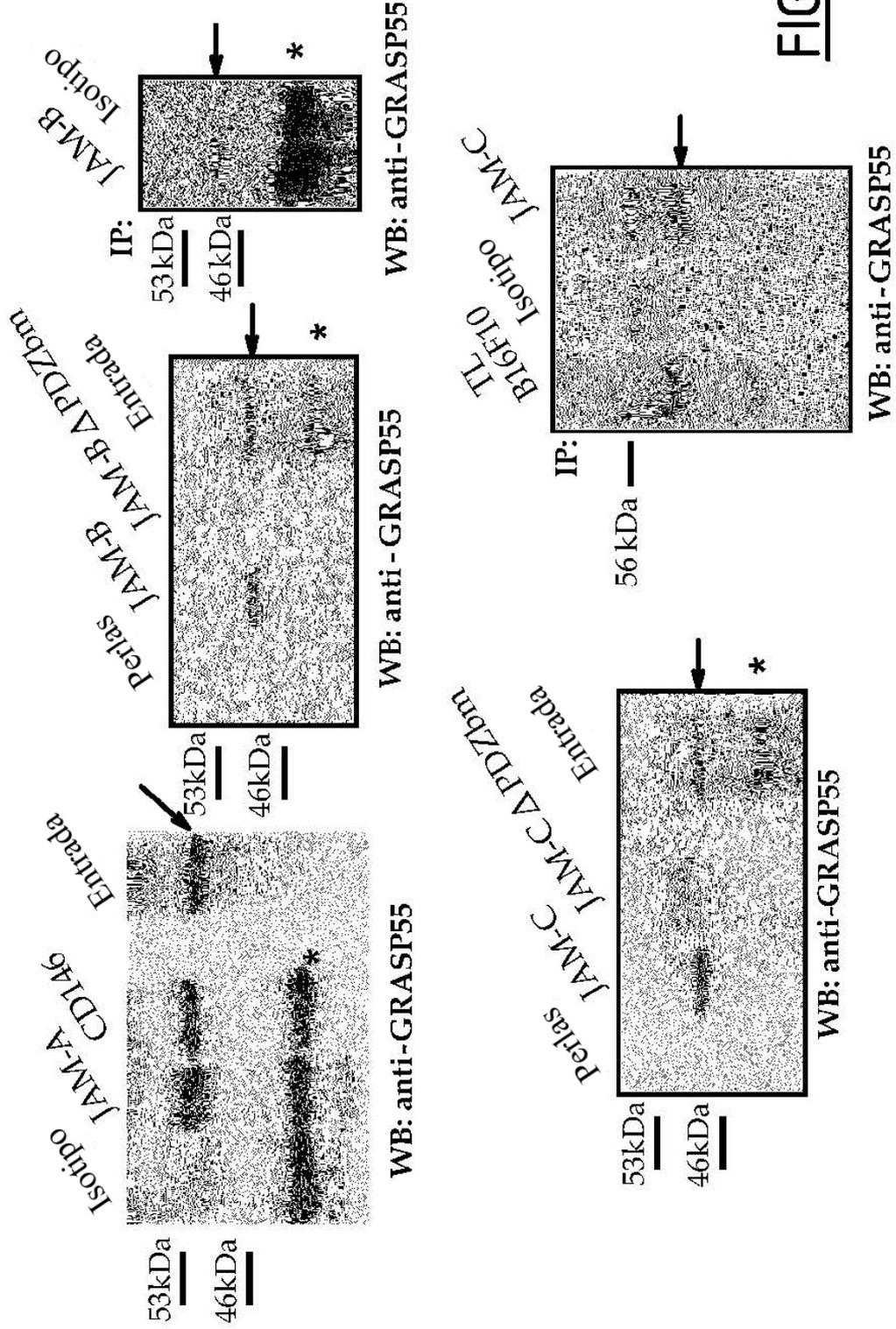
**REIVINDICACIONES**

1. Un antagonista de la proteína de apilamiento y de reensamblaje del aparato de Golgi de 55 kDa (Grasp55), para su uso como un medicamento, en el que dicho antagonista es un anticuerpo que inhibe la interacción de Grasp55 con una molécula de adhesión de unión (JAM) o un ácido nucleico que se dirige a un ARNm que codifica Grasp55.
2. El antagonista para su uso según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis y una enfermedad inflamatoria.
3. El antagonista para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho antagonista está destinado a su uso en la prevención de metástasis.
4. El antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ácido nucleico es un ARNip o un ARNhc.
5. Uso de:
  - la proteína de apilamiento y de reensamblaje del aparato de Golgi de 55 kDa (Grasp55); o
  - un polipéptido que comprende los aminoácidos 1 a 160 de Grasp55 murino o la región correspondiente de una proteína Grasp55 obtenida de otra especie;
 como diana para detección selectiva de compuestos susceptibles de tratar o prevenir una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis y una enfermedad inflamatoria.
6. Un procedimiento para la detección selectiva de compuestos susceptibles de tratar o prevenir una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis y una enfermedad inflamatoria que comprende las etapas de:
  - a) suministro de un primer polipéptido que comprende los aminoácidos 1 a 160 de proteína de apilamiento y de reensamblaje del aparato de Golgi murina de 55 kDa (Grasp55) o la región correspondiente de una proteína Grasp55 obtenida de otra especie, o una célula que expresa dicho primer polipéptido;
  - b) suministro de un segundo polipéptido que es un compañero de unión de Grasp55, o una célula que expresa dicho segundo polipéptido;
  - c) suministro de un compuesto candidato;
  - d) determinación de si dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la unión de dicho primer polipéptido a dicho segundo polipéptido;
 en el que la determinación de que dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido indica que dicho compuesto candidato es susceptible de tratar o prevenir dicha enfermedad.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho segundo polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en:
  - un polipéptido que comprende los aminoácidos 260 a 299 de molécula de adhesión de unión A (JAM-A) murina, o la región correspondiente de una proteína JAM-A obtenida de otra especie;
  - un polipéptido que comprende los aminoácidos 258 a 298 de molécula de adhesión de unión B (JAM-B) murina, o la región correspondiente de una proteína JAM-B obtenida de otra especie;
  - un polipéptido que comprende los aminoácidos 263 a 310 de molécula de adhesión de unión C (JAM-C), o la región correspondiente de una proteína JAM-C obtenida de otra especie;
  - un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 35 a 40; y
  - CD146.
8. El procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, en el que la etapa de determinación de si dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido se realiza a través de un ensayo ELISA.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que:

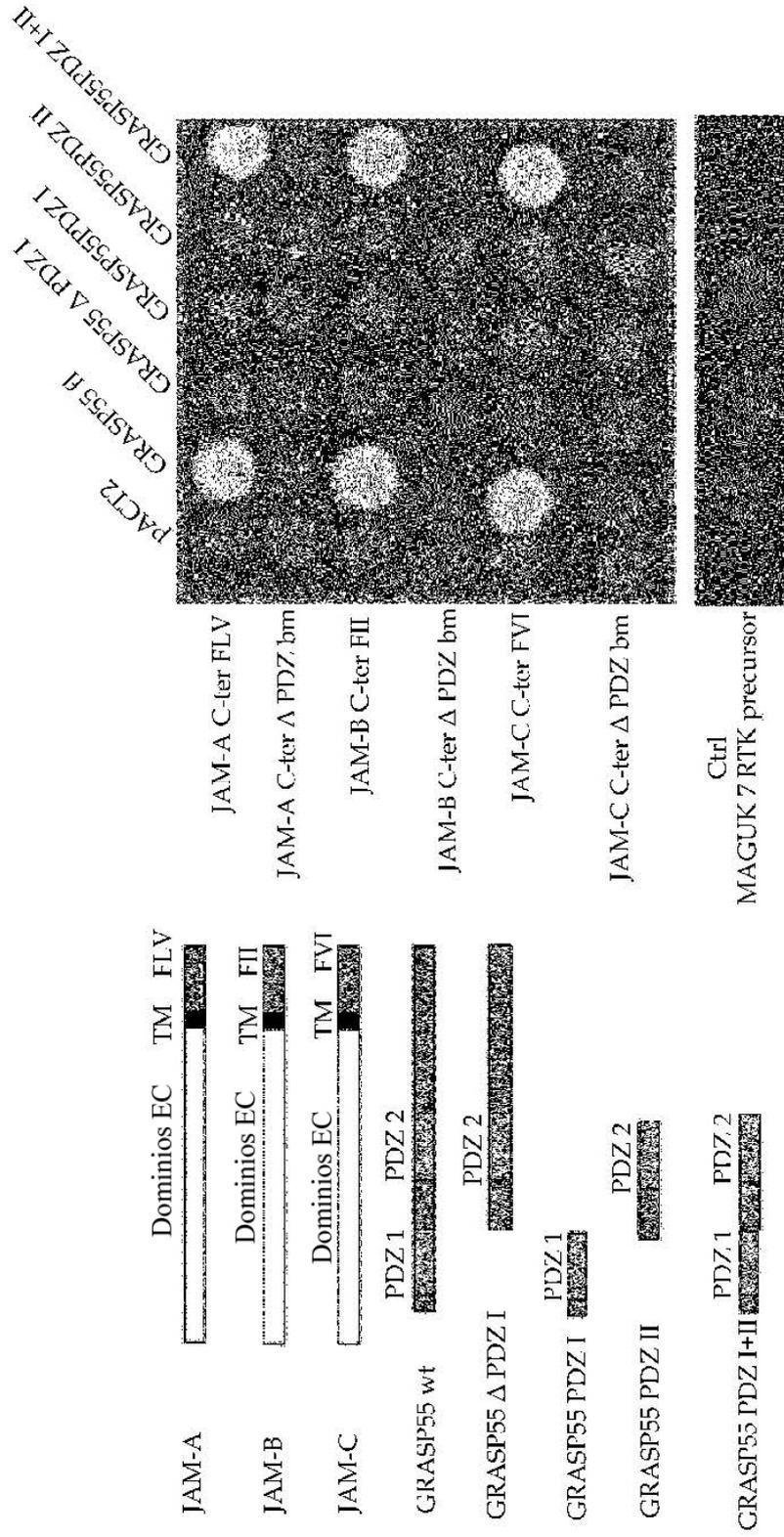
- a) el primer polipéptido comprende además una secuencia de aminoácidos que codifica glutatión S-transferasa (GST); y
- b) el segundo polipéptido está biotinilado;

5 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la determinación de si dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la unión de dicho primer polipéptido con dicho segundo polipéptido comprende:

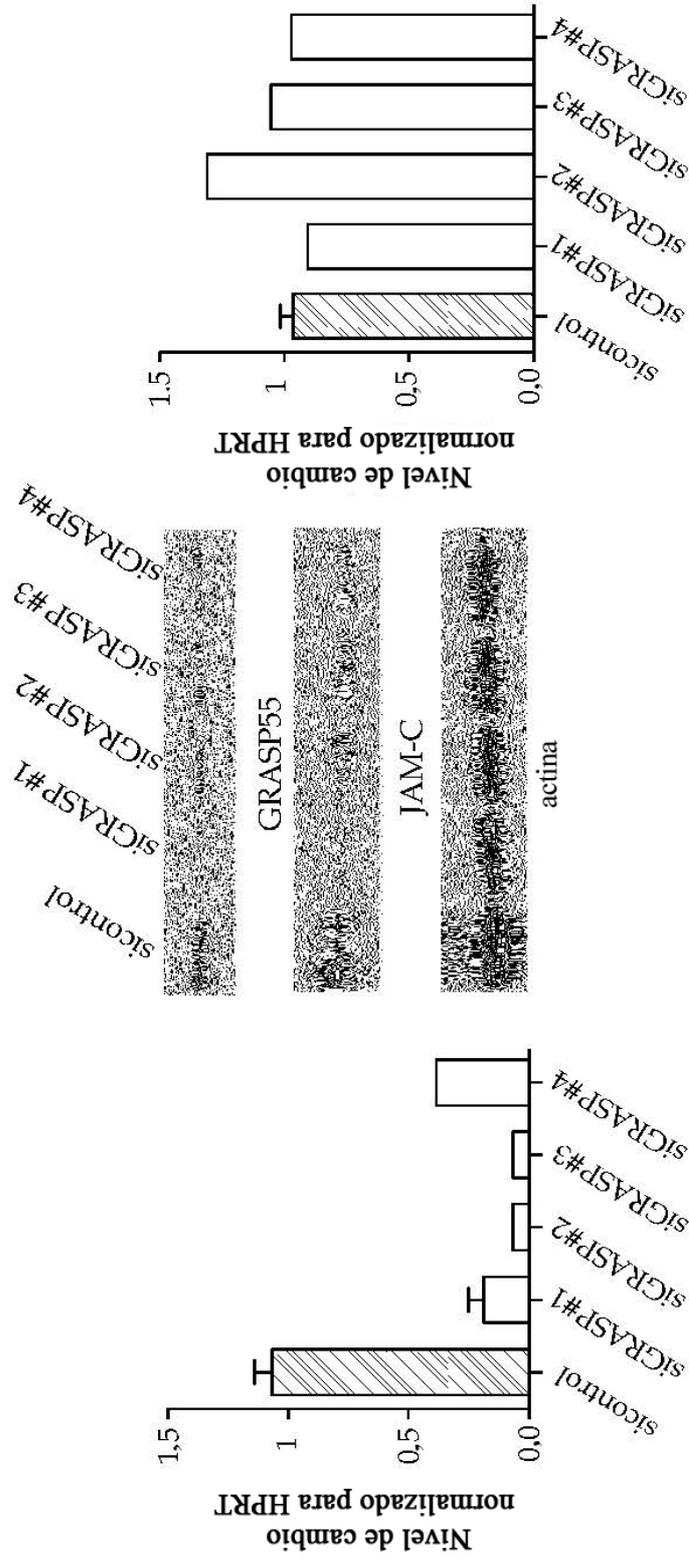
- a) la incubación de una placa con el primer polipéptido, en el que dicha placa está recubierta con glutatión;
  - b) la adición del segundo polipéptido, con y sin el compuesto candidato;
- 10 c) el lavado de las placas;
- d) la adición de una peroxidasa de rábano picante (HRP) que está unida a estreptavidina;
  - e) la adición de un sustrato cromógeno de HRP;
  - f) la medida de la densidad óptica (DO) en presencia y en ausencia del compuesto candidato;
- 15 en el que la medida de una DO que es menor en presencia del compuesto candidato que en ausencia del compuesto candidato indica que el compuesto candidato es capaz de inhibir la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que comprende además la
- 20 etapa de determinar, en un modelo celular o animal no humano de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis y enfermedad inflamatoria, si el compuesto seleccionado es capaz de tratar dicha enfermedad.



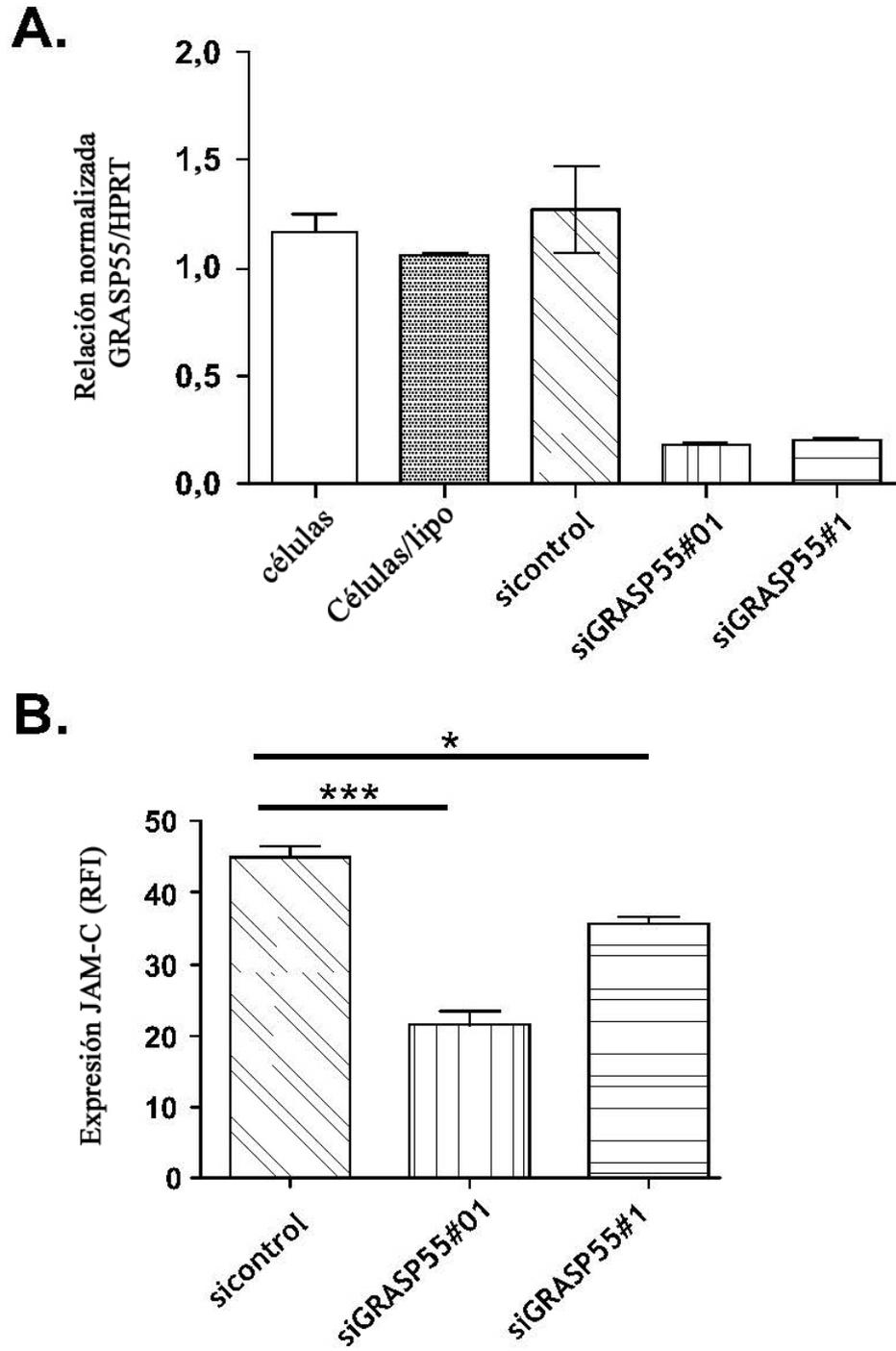
**FIG.1**



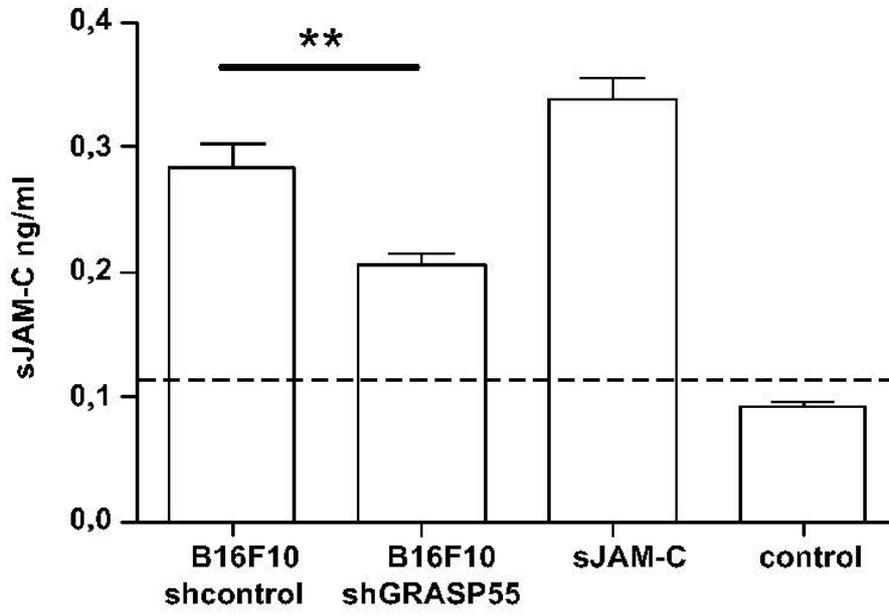
**FIG.2**



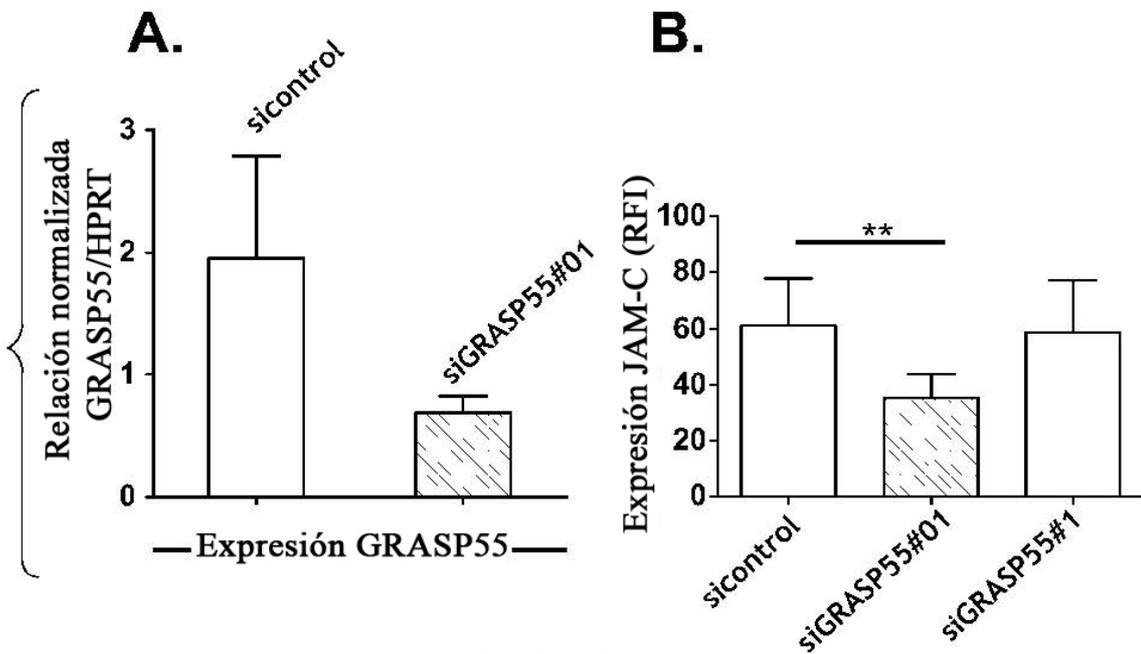
**FIG.3**



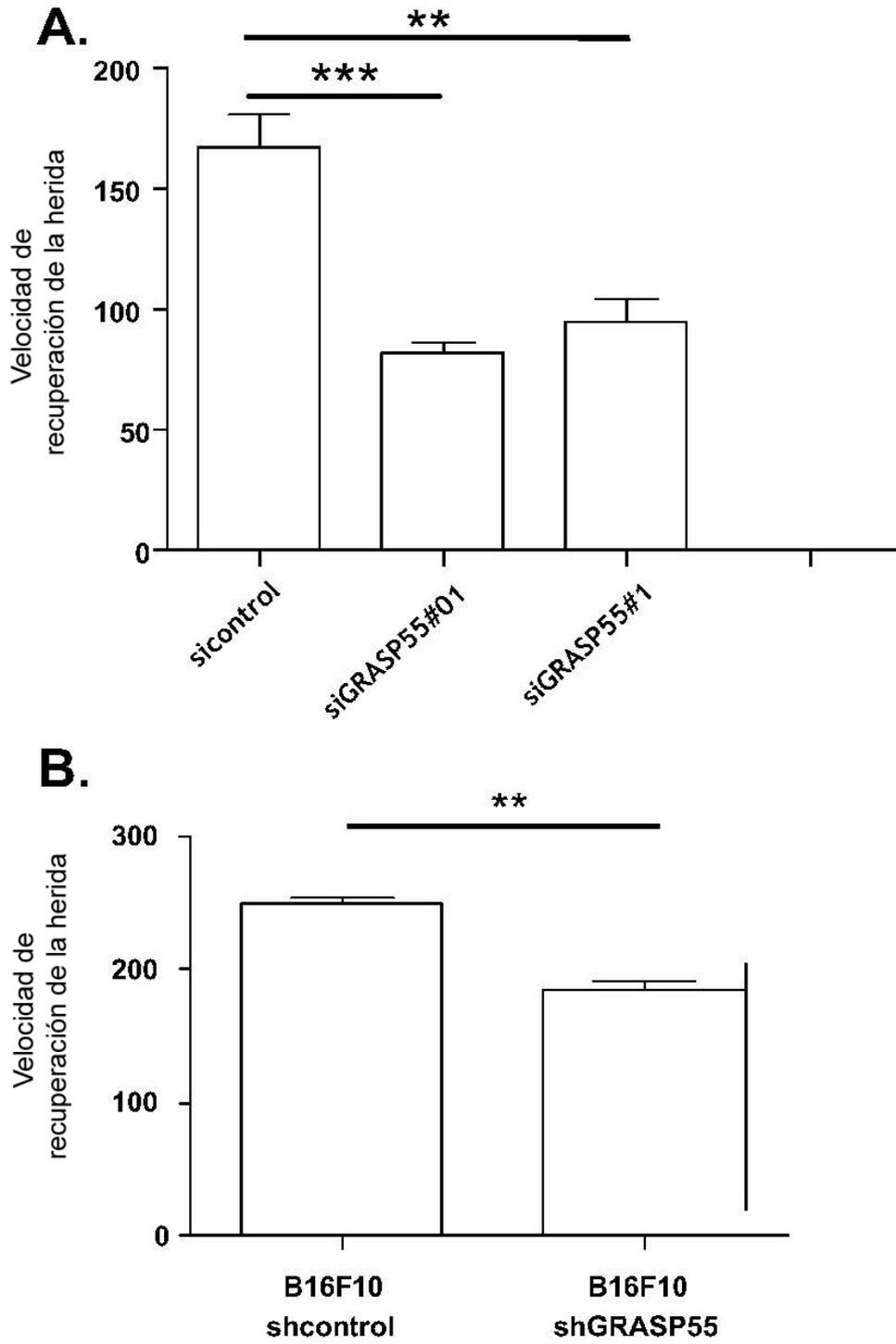
**FIG.4**



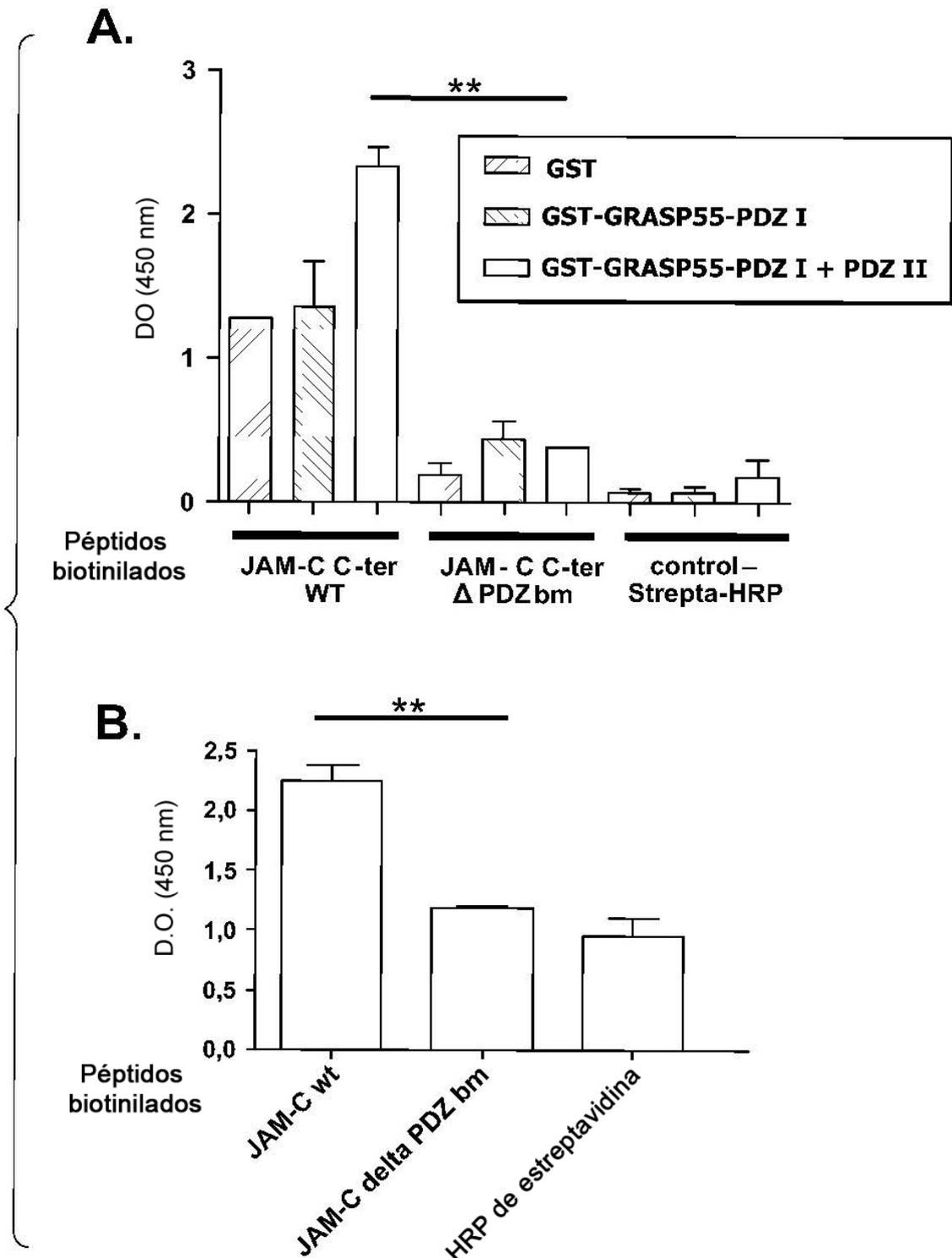
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG.7**



**FIG.8**



```
1 MGSSQSVEIFGGGTEGYHVLRVQENSPGHRAGLEPFEDFIVSINGSRNLKNDNTLKDLK
1 MGSSQSVEIFGGGTEGYHVLRVQENSPGHRAGLEPFEDFIVSINGSRNLKNDNTLKDLK
*****

61 ANVEKPVKMLIYSSKTLELRETSVTPSNLWGCQGLLGVSIRFCSFDGANENVVHVLEVES
61 ANVEKPVKMLIYSSKTLELREASVTPSNLWGCQGLLGVSIRFCSFDGANENVVHVLEVES
*****

121 NSPAALAGLRPHSDYIIGADTMNESEDLFSLIETHEAKPLKLYVYNTDTDNCREVIITP
121 NSPAALAGLRPHSDYIIGADTMNESEDLFSLIETHEAKPLKLYVYNTDTDNCREVIITP
*****

181 NSAWGGEGLGCGIGYGYLHRIPTRPFEEGKKISLPGQMTGTFITPLKDGFTFVQLSSVN
181 NSAWGGEGLGCGIGYGYLHRIPTRPFEEGKKISLPGQMTGTFITPLKDGFTFVQLSSVS
*****

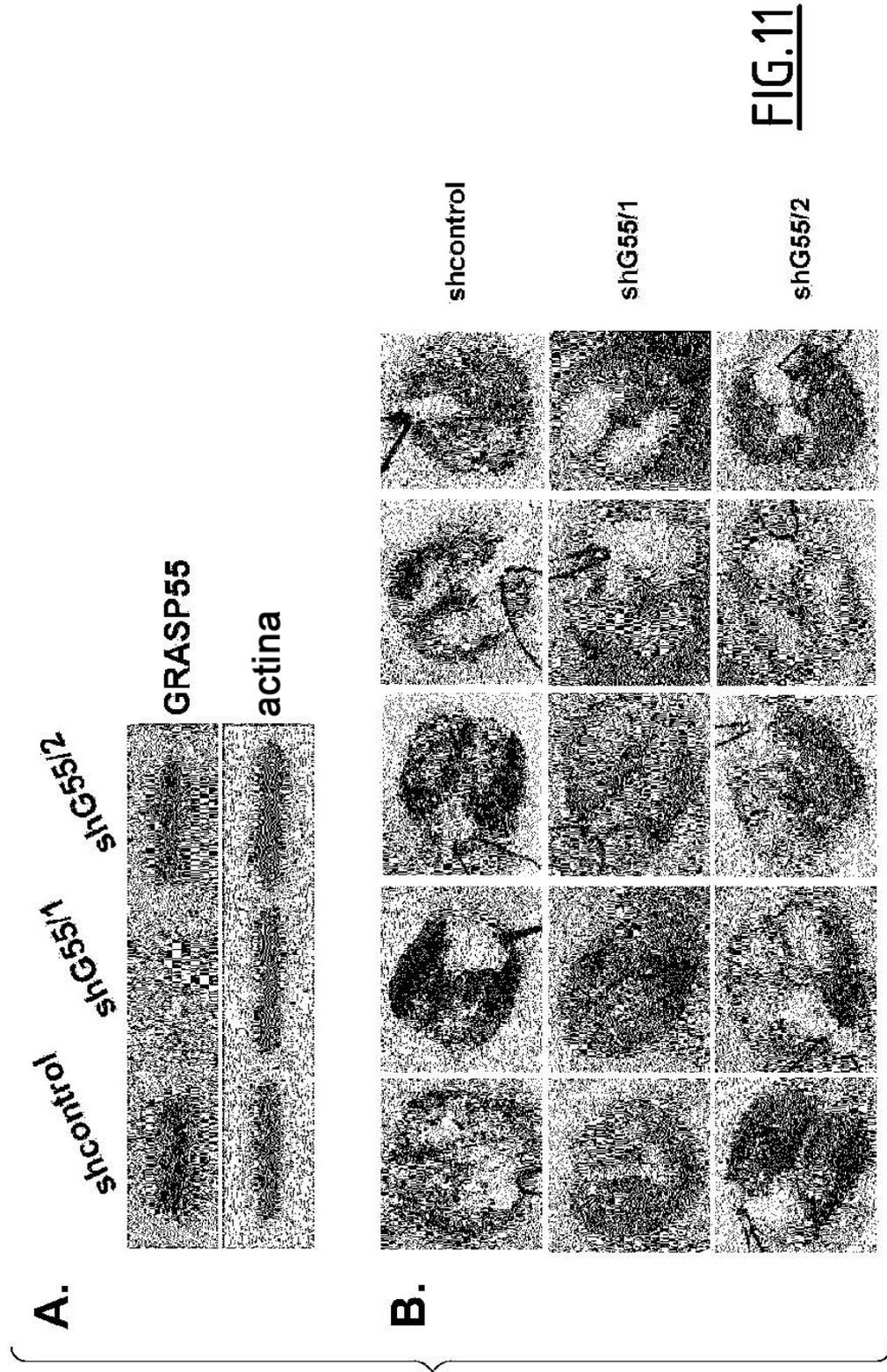
241 PPSLSPPGTTGIEQSLTGLSISSTPPAVSSVLSTGVPTVPLLPQVNPQSLTSVPPMNPAT
241 PPSLSPPGTTGVEQSLTGLSISAPPVSNVLSTGVPTVPLLPQVNPQSLASMPMNPAT
*****

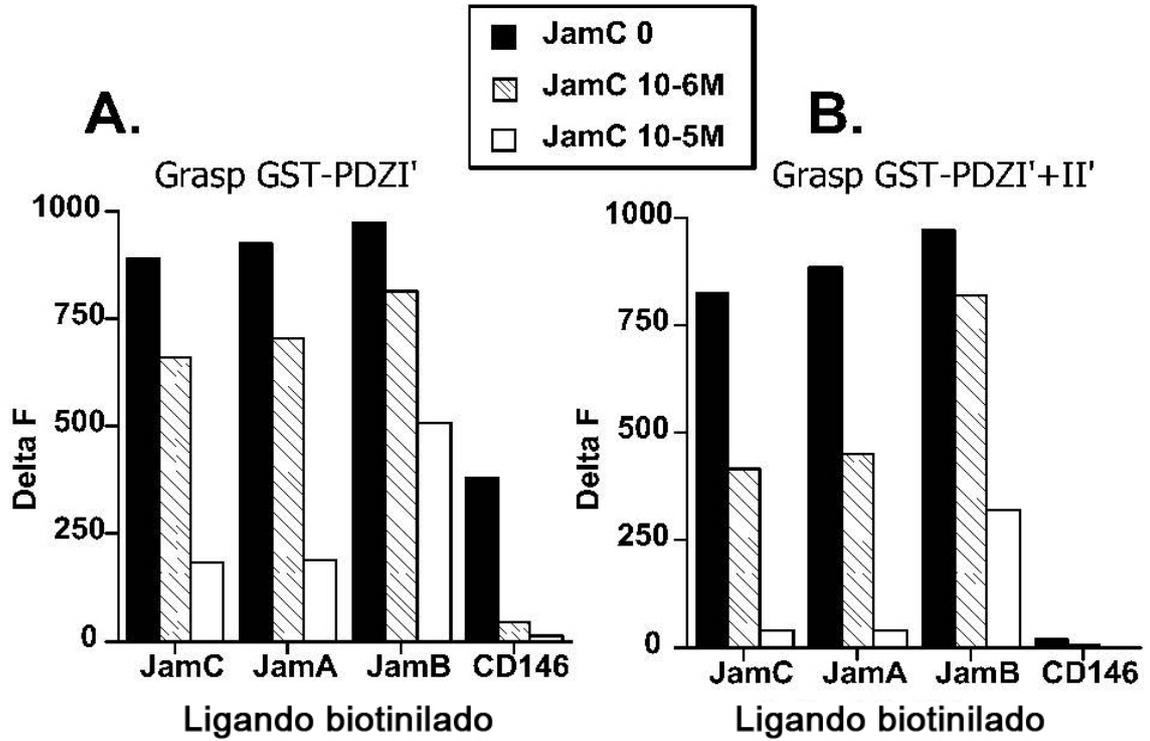
301 TLPGMPLPAGL:PNT:PNT:---NLNLPAHIMPVGLPELVNPGI:FPPLPSMPPRNLPGLA
301 TLPSLMPLSAGLPSLPNLPSLSNFNLPAPHIMPVGLPELGSPLPPLPSLPNRNLPGLA
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

357 FLPLPSEFLPSFPLVPESSSAASSGELLSSLPPTSNA PSDPATTTAKADAASSETVDVTF
361 FLPLMSDFLPSFPLVPEGSSAASAGEPLSSLP-AMGPPSDPVMTTAKADA-SSLTVDVTS
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

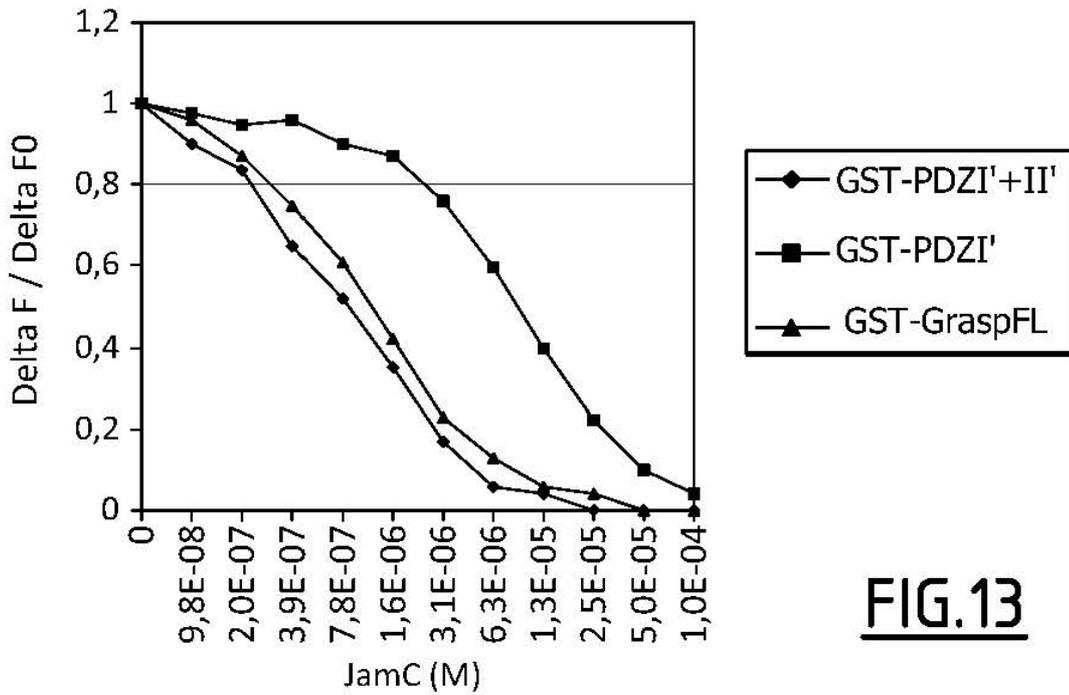
417 FTAKAPTTVEDRVGDSFVSEKPVSAAVDANASESP (SEQ ID NO: 2)
419 PASKVPTTVEDRVSDCTPAVEKEVS---DADASEPS (SEQ ID NO: 1)
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

**FIG.10**

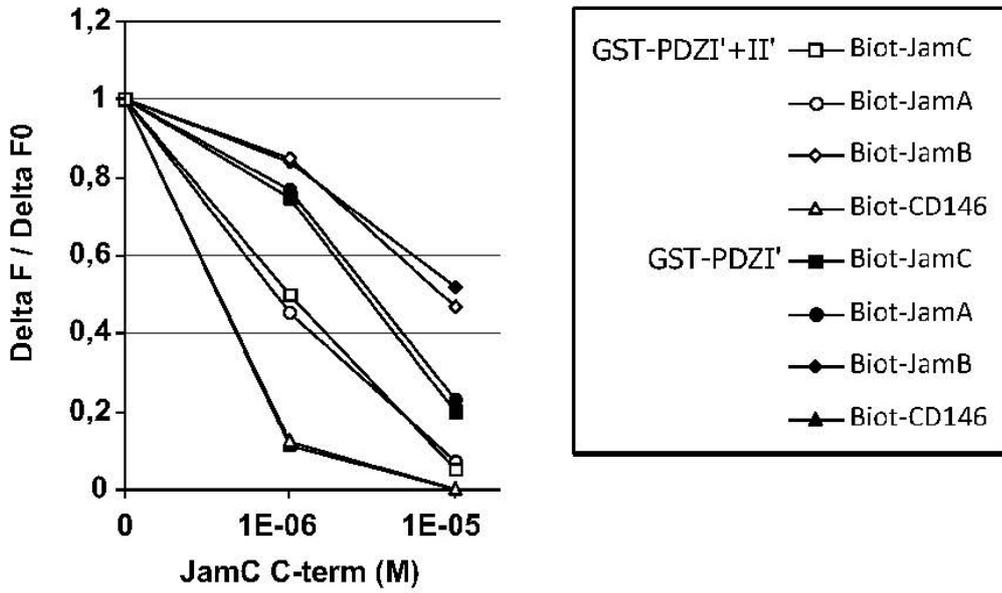




**FIG.12**

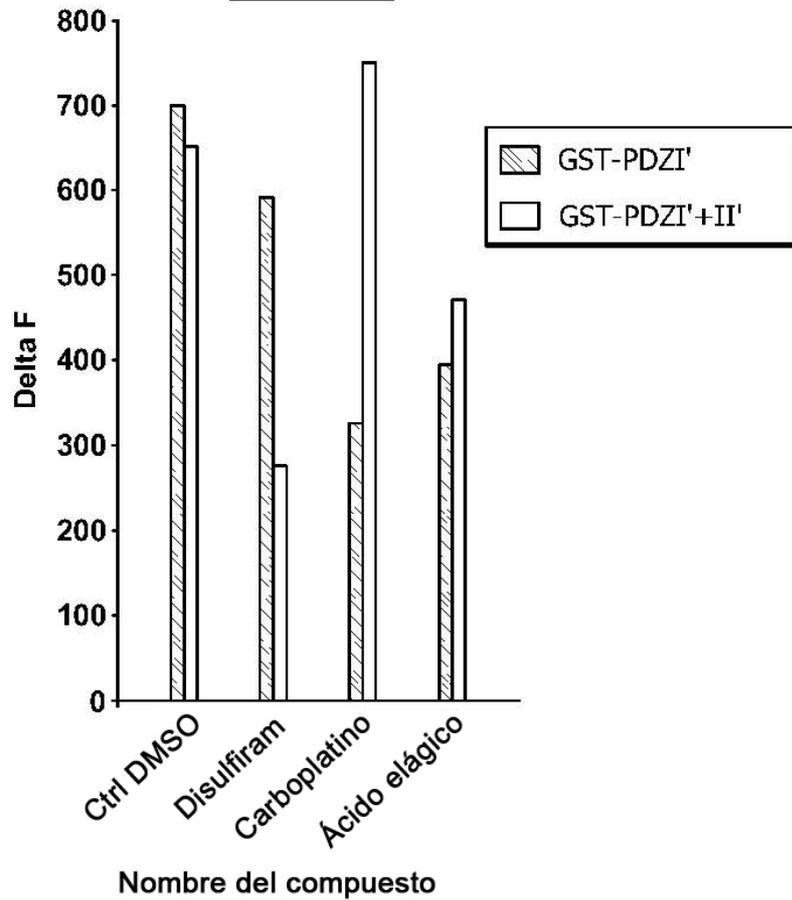


**FIG.13**

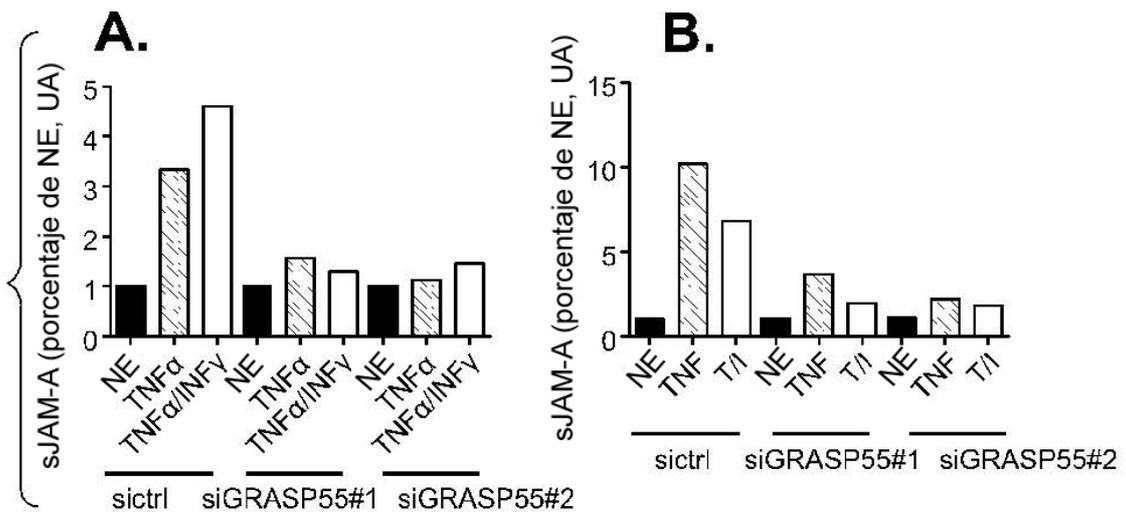
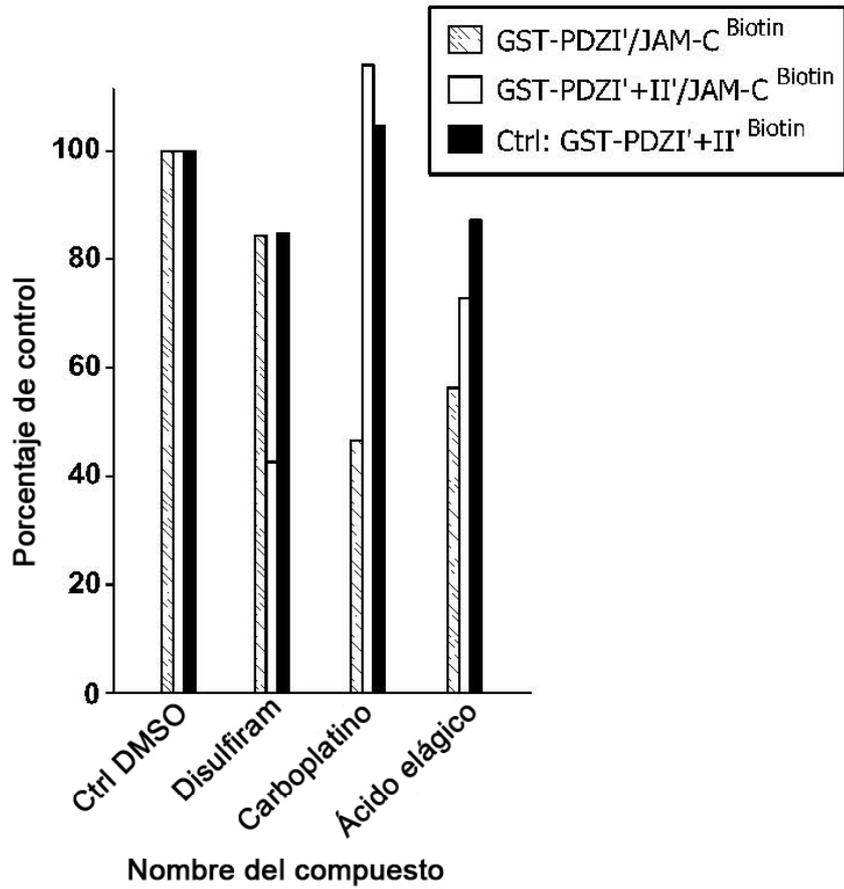


**FIG. 14**

**FIG. 15**



**FIG.16**



**FIG.17**