

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 906**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008** E 13162773 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016** EP 2620451

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

30 Prioridad:

**05.04.2007 US 910362 P**  
**15.10.2007 US 980026 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.03.2017**

73 Titular/es:

**MORPHOTEK, INC. (100.0%)**  
**210 Welsh Pool Road**  
**Exton, PA 19341, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 606 906 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para inhibir la unión de la endosialina a ligandos

## Campo

5 La presente invención se encuadra, de forma general, en el campo de la inmunoterapéutica. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones y métodos para el desbaratamiento de la interacción de la endosialina con sus sustratos, a fin de inhibir las funciones celulares, incluidas la angiogénesis y la movilidad celular.

## Antecedentes

10 La angiogénesis es un proceso regulado que conlleva la formación de vasos sanguíneos nuevos. Desempeña una función esencial en el crecimiento, el desarrollo embrionario, la cicatrización de las heridas y otros procesos fisiológicos normales (Yancopoulos *et al.* (2000) *Nature*, 407:242-8). Dentro del capilar en desarrollo, las proteínas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) actúan como un andamiaje estructural para los tejidos endoteliales y tumorales en proliferación; además, proporcionan un apoyo para el crecimiento de las células tumorales. La angiogénesis *de novo* está implicada en diversos estados patológicos, incluido el cáncer, en que aparece una formación de vasos sanguíneos nuevos “de tipo embrionario” (que, en este documento, denominaremos “neovascularización”), diferentes a los vasos sanguíneos (vasculatura) normales en cuanto a su estructura y a su función (Hanahan *et al.* (2000) *Cell*, 100:57-70). Se ha demostrado en diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, usando diversos sistemas de modelos de angiogénesis, que existen diferencias biológicas entre la vasculatura normal y la vasculatura asociada a patologías, de lo que se deriva la posibilidad de compuestos anti-angiogénicos novedosos que puedan inhibir selectivamente la formación de vasos sanguíneos de tipo embrionario en las células endoteliales asociadas a tumores, para así tratar las enfermedades de tipo neovascular. A raíz de las oportunidades de un tratamiento así, se ha desatado una búsqueda intensiva de posibles dianas que puedan inhibir de manera específica el crecimiento y la función de las células endoteliales o estromales (fibroblastos, pericitos, etc.) asociadas a los tumores y a otras enfermedades neovasculares.

25 En un intento de identificar tales dianas, se han concebido estrategias para identificar antígenos en la superficie de las células del estroma tumoral, así como para aislar proteínas específicas o ARN específico que se expresen en células del estroma tumoral (Rettig *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10832-6; St. Croix *et al.* (2000) *Science*, 289:1197-1202). Gracias a dichas estrategias, se ha descubierto una proteína de superficie celular que parece expresarse de manera específica en las células del estroma tumoral; se la denomina “endosialina” (o “marcador endotelial tumoral 1” [TEM1] o CD248).

30 Examinando los patrones de expresión génica en tejido normal y neoplásico, se ha descubierto que existe un aumento de la expresión del ARNm correspondiente a la endosialina en la neovasculatura tumoral. (St Croix *et al.* (2000) *Science*, 289:1197-1202). Se han observado niveles similares de expresión de la endosialina en los tejidos de cáncer colorrectal (Rmali *et al.* (2005) *World J. Gastroenterol.*, 11:1283-1286) y de cáncer de mama (Davies *et al.* (2004) *Clin. Exp. Metastasis*, 21:31-37) humanos, así como en los histiocitomas humanos (Dolznig *et al.* (2005) *Cancer Immun.*, 5:10). Se ha observado expresión de la endosialina humana en el glioblastoma muy invasivo, en los astrocitomas anaplásicos y en los carcinomas metastásicos, incluidos los melanomas (Brady *et al.* (2004) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63:1274-1283; Huber *et al.* (2006) *J. Cutan. Pathol.*, 33:145-155).

40 En estudios inmunohistoquímicos, gracias al uso de anticuerpos, se ha descubierto que hay una intensa expresión de la endosialina en diversas células endoteliales neovasculares, fibroblastos y/o pericitos (Virgintino *et al.* (2007) *Angiogenesis*, 10:35-45) de los tejidos malignos; en cambio, su expresión es limitada en líneas celulares “derivadas” (obtenidas) de cultivos de células endoteliales de tipo embrionario, como, entre otros, de HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) o de HMVEC (células endoteliales de microvasculatura dérmica neonatal). Mediante análisis de los anticuerpos, polipéptidos o ligandos no proteínicos que se pueden unir a la endosialina, se ha descubierto un subconjunto de tales moléculas que es capaz de suprimir la capacidad de la endosialina para unirse a su sustrato y/o de suprimir actividades intracelulares que conducen a la éstasis o muerte celular.

50 Rettig *et al.* describieron anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos en los vasos sanguíneos de diversos tipos de cáncer (Rettig *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10832-6). Uno de dichos anticuerpos monoclonales fue designado como FB5, y fue generado mediante la inmunización de ratones con fibroblastos embrionarios humanos. FB5 reconoce una proteína de ~100 kDa en la superficie de una línea celular de neuroblastoma, LA1-5s (patente estadounidense N.º 5.342.757). FB5 es un anticuerpo (IgG1) murino que se une a la endosialina, y se ha demostrado que reconoce a las células endoteliales asociadas a diversos tipos de cáncer diferentes. Conforme a la evaluación de su estructura, se ha clasificado a la endosialina como una proteína integral de membrana similar a las lectinas de tipo C; está compuesta de cinco dominios globulares extracelulares (incluido un dominio lectina de tipo C, un dominio que tiene similitudes con el patrón Sushi/ccp/scr, y tres repeticiones EGF). Además, la proteína contiene una región similar a la mucina, un segmento transmembrana y una cola citoplásmica corta. La proteína parece ser una glicoproteína. El análisis de carbohidratos revela que en la proteína nuclear de la endosialina hay una abundante glicosilación con enlaces al oxígeno (Christian *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:48588-48595). En trabajos posteriores, se combinaron las regiones determinantes de complementariedad (CDR,

por sus siglas en inglés) del FB5 murino con el esqueleto de una IgG1 humana, a fin de crear un anticuerpo humanizado que se une a los vasos sanguíneos que se encuentran dentro de los tejidos malignos, así como a los que se encuentran dentro de un subconjunto de células en cultivos de HMVEC. En US 6.090.930A se describe la producción de varios anticuerpos murinos humanizados específicos del antígeno FB5, que es reconocido por el anticuerpo FB5 murino.

Los ratones con gen *Tem1* inactivado ("knockout") se desarrollan con normalidad y la cicatrización de sus heridas es normal; de ello, parece desprenderse que la endosialina no es necesaria para la neovascularización durante el desarrollo fetal ni durante la reparación de heridas. (Nanda *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3351-3356). Sin embargo, cuando se implantaron células de cáncer colorrectal en zonas abdominales de ratones con *Tem1* inactivado, la pérdida de expresión de la endosialina se correlacionó con una reducción del crecimiento, invasión y metástasis tumorales, en comparación con los animales parentales. Se ha demostrado que la ausencia de expresión de la endosialina reduce el crecimiento, la invasión y las metástasis de xenoinjertos de tumores humanos en un ratón con el gen de la endosialina inactivado. (Nanda *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3351-3356). Además, la carencia de endosialina condujo a un aumento en la cantidad de pequeños vasos sanguíneos inmaduros y redujo la cantidad de vasos sanguíneos tumorales medianos y grandes.

La neovascularización está vinculada a diversos estados patológicos. En el caso del cáncer, se cree que la neovascularización es importante para el suministro de sangre a los tumores. Hay trastornos no oncológicos ni malignos, tales como la retinopatía y la degeneración macular, en los que la neovascularización incontrolada ocasiona pérdida de la visión (Wilkinson-Berka (2004) *Cun. Pharm. Des.*, 10:3331-48; Das y McGuire (2003) *Prog. Retin. Eye Res.*, 22:721-48). Asimismo, en varios informes se ha descrito que la neovascularización juega un papel en las enfermedades inflamatorias (Paleolog y Miotla (1998) *Angiogenesis*, 2(4):295-307). Si se conciben métodos con los que entender mejor las rutas moleculares que se dan en las células endoteliales de tipo embrionario, en las células precursoras y en las células asociadas a las células endoteliales (pericitos, fibroblastos, etc.) vinculadas a estos estados patológicos, se podrán desarrollar fármacos novedosos con los que tratar dichos estados patológicos. Por otro lado, la neovascularización está también asociada a la cicatrización de las heridas (Galiano *et al.* (2004) *Am. J. Pathol.*, 164:1935-47). Si se logra esclarecer las rutas moleculares que promueven la vascularización para la cicatrización de las heridas, se podría obtener capacidad para identificar fármacos y factores que puedan promover procesos para mejorar el tratamiento de las heridas y lesiones asociadas a traumatismos, quemaduras e infecciones.

Un problema difícil para una terapia antiangiogénica y proangiogénica eficaz es la naturaleza no definida de los procesos biológicos de las moléculas y de las rutas asociadas que son importantes para activar los procesos celulares vinculados a la neovascularización (Bagley *et al.*, *Eye Res.*, 63:5866-73). La capacidad de identificar y determinar moléculas y su función en la regulación de una ruta dada puede hacer posible aislar compuestos eficaces que tengan actividad estimuladora o inhibidora en trastornos en los que hay neovascularización, como el cáncer, la inflamación, las enfermedades oculares, las cardiopatías y la cicatrización/reparación de heridas y lesiones. La capacidad de aislar y de estudiar esos compuestos mediante ensayos de tipo molecular proporcionaría mayor utilidad de cara a la evaluación de sus efectos, en lo referente a la supresión o estimulación específica de la biología normal de las células que participan en la neovascularización, diferentes de las células endoteliales de tipo adulto asociadas a los vasos sanguíneos en los tejidos adultos normales (Asahara y Kawamoto (2004) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287:C572-9).

### Compendio

En uno de sus aspectos, la invención proporciona un anticuerpo que se une de manera específica a la endosialina (dicho anticuerpo es producido por células que tienen el N.º de acceso ATCC: PTA-9017), o un fragmento de anticuerpo que se une a antígeno (fragmento de unión al antígeno), específico de la endosialina.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula recombinante que expresa un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la invención.

Además, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención.

La invención proporciona también una composición para administración a un sujeto, y dicha composición comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención.

La invención proporciona asimismo un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención, para uso en medicina, incluidas la terapia y el diagnóstico, y preferiblemente, para uso en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la interacción de la endosialina expresada en la superficie de una célula con el colágeno o con la fibronectina, para la fabricación de un medicamento de uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención inhibe la expresión de la endosialina en una célula

que expresa la endosialina a nivel genético. Los ligandos de la endosialina pueden ser proteínas de la matriz extracelular, tales como el colágeno o la fibronectina. En algunas realizaciones, el ligando puede ser el colágeno I o el colágeno IV. En realizaciones preferidas, la célula puede ser una célula de mamífero. La regulación de la expresión de la endosialina a nivel genético puede lograrse mediante cualquiera de los métodos adecuados conocidos en este campo de la técnica; por ejemplo, molécula de ácido nucleico antisense (“antisentido”, “en sentido opuesto”), ARN de doble cadena, ribozimas, ribozimas “hammerhead” (ribozimas en forma de cabeza de martillo), oligonucleótidos “decoy” (oligonucleótidos “señuelo”) y similares. La regulación de la expresión de la endosialina puede también lograrse mediante inactivación (o reducción de la expresión) del gen que codifica la endosialina.

La obstrucción de la endosialina de la superficie celular puede lograrse mediante cualquiera de los métodos adecuados conocidos en este campo de la técnica; por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a la endosialina, anticuerpos que se unen específicamente a un ligando de la endosialina y similares. Los anticuerpos adecuados pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, fragmentos fijadores de antígeno que se unen específicamente al antígeno y similares. En algunas realizaciones, la afinidad del anticuerpo por el antígeno es preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-7}$  M aproximadamente, más preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-8}$  M aproximadamente, aún más preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-9}$  M aproximadamente, y lo más preferible es que sea inferior a  $1 \times 10^{-10}$  M aproximadamente. En algunas realizaciones preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo anti-endosialina o fragmento de unión al antígeno que reconoce específicamente a la endosialina. Los anticuerpos M4 (que es producido por las células que tienen el N.º de acceso ATCC PTA-9017 de la invención) y M4.1 son anticuerpos humanizados anti-endosialina humana. Si bien los anticuerpos M4 y M4.1 comparten la secuencia de la cadena ligera, difieren en su cadena pesada en una sola secuencia de aminoácidos que se observa, por ejemplo, en la diferencia entre el residuo 429 de la SEC N.º ID: 20 y el residuo 429 de la SEC N.º ID: 24. El cambio de aminoácido es el resultado de la alteración de un único nucleótido que se observa, por ejemplo, en la diferencia entre el nucleótido 1286 de la SEC N.º ID: 19 y el nucleótido 1286 de la SEC N.º ID: 23.

La inhibición de la interacción de la endosialina con ligandos de la endosialina puede afectar a rutas y a cascadas, así como a efectos que de otro serían producidos posteriormente por la interacción normal. Por ejemplo, obstruyendo o inhibiendo la interacción de una célula que expresa la endosialina con un ligando de la endosialina se puede inhibir la activación de las integrinas, la activación de las metaloproteasas de la matriz y/o la expresión de las metaloproteasas de la matriz. Se puede inhibir la movilidad celular. Se puede inhibir la angiogénesis o la neovascularización.

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

En la presente invención se describe también un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención para uso en el tratamiento del cáncer. El tratamiento puede efectuarse mediante la inhibición de la angiogénesis o de la neovascularización. Dicho uso puede incluir la inhibición *in vitro* e *in vivo* de la angiogénesis o de la neovascularización. Puede administrarse a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno que se una específicamente a la endosialina, o de una composición que obstruya a la endosialina que se expresa en la superficie de una célula, de manera que se inhiba la interacción de la célula con un ligando de la endosialina. Dicha inhibición suprime la angiogénesis y/o la neovascularización en un tejido, en un órgano o en un neoplasma en el sujeto a quien se le administra la composición. Los ligandos de la endosialina pueden ser proteínas de la matriz extracelular, tales como el colágeno (por ejemplo, colágeno I o colágeno IV) o la fibronectina. La composición puede comprender un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, que se describen y ejemplifican en la presente invención, capaz de obstruir físicamente la interacción de la endosialina de la superficie celular con al menos un ligando de la endosialina. Los anticuerpos adecuados pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, fragmentos de anticuerpo y similares.

### Breve descripción de los dibujos

En las Figuras 1A y 1B se muestran análisis inmunohistoquímicos de células positivas a endosialina de un tejido maligno. Se aislaron tumores de pacientes con cáncer colorrectal y se congelaron ultrarrápidamente en nitrógeno líquido dichos tumores aislados. Se realizaron cortes finos de esas muestras y se tiñeron dichos cortes con anticuerpo anti-endosialina o con anticuerpo isotipo de control. Como se puede observar, los vasos sanguíneos del tumor (Figura 1A) dieron positivo a endosialina, mientras que los cortes en serie teñidos con anticuerpo isotipo de control dieron negativo (Figura 1B).

En las Figuras 2A y 2B se muestran análisis inmunohistoquímicos de células positivas a endosialina de un tejido normal. Se aislaron mediante biopsia tejidos normales de pacientes y se congelaron ultrarrápidamente en nitrógeno líquido dichos tejidos normales aislados. Se realizaron cortes finos de esas muestras y se tiñeron dichos cortes con anticuerpo anti-endosialina o con anticuerpo isotipo de control. Como se puede observar, el tejido normal contenía pocas células positivas a endosialina (CPE, flecha, Figura 2A), mientras que los cortes en serie teñidos con

anticuerpo isotipo de control dieron negativo (Figura 2B). Muchos tejidos normales analizados tenían pocas CPE, conforme a lo determinado mediante tinción *in situ* o tinción con anticuerpos.

La Figura 3 muestra células positivas a endosialina aisladas de cultivos primarios de células endoteliales. Los cultivos de HMVEC se enriquecieron para obtener más CPE, mediante concentración en placa. Después, se compararon los cultivos enriquecidos en endosialina con cultivos de HMVEC parentales, en cuanto al porcentaje de células que expresaban la endosialina. Como se ilustra, el cultivo enriquecido tenía un número mucho mayor de células positivas a la endosialina que el cultivo parental no enriquecido, conforme a lo determinado mediante inmunotinción con un anticuerpo anti-endosialina y, después, con un anticuerpo secundario fluorescente conjugado. La cantidad de células de cada campo se determinó mediante microscopía lumínica.

La Figura 4 muestra que la endosialina recombinante (Fc-TEM1) se une a proteínas de la matriz extracelular (EMP, por sus siglas en inglés). Se bloquearon, mediante un tampón de ensayo ELISA, antes de la adición, a concentraciones crecientes, de proteína Fc-TEM1 purificada, placas de ELISA previamente recubiertas de las siguientes EMP: fibronectina (FN), colágeno (COL, incluidos colágeno de tipo I [COL I] y colágeno de tipo IV [COL IV]), vitronectina (VN), laminina (LN) o gelatina (Gel). Tras una incubación de dos horas de duración, se lavaron las placas y se comprobó si había unión, mediante un mA b (siglas en inglés de "anticuerpo monoclonal") secundario de cabra antimurino, conjugado con peroxidasa (HRP, peroxidasa de rábano), específico de la cola Fc, usando condiciones ELISA estándar. Se lavaron y revelaron las placas, y luego se comprobaron usando un lector de placas a una DO de 450 nm. Como se muestra en la Figura 4A, la Fc-TEM1 se unió firmemente a FN y COL, pero se observó una unión débil a LM, VN o Gel. En el caso de la Figura 4B, se revistió previamente una placa de ELISA, durante toda la noche, con los siguientes antígenos: Enterotoxina B de *Staphylococcus* (STEB), ovoalbúmina (OVA), gammaglobulina bovina (BGG), el antígeno glicoproteína de 90 kD asociado a tumores que se expresa en la mayoría de las células de melanoma (TA90), lisozima de huevo de gallina (HEL), toxoide tetánico (TT), BSA (seroalbúmina bovina) al 1%, mesotelina humana, GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos) humano, IgG de cabra e IgG de ratón. Se añadió Fc-TEM1 en cantidades crecientes (5, 10, 50 µg/ml), y se dejó que se adhiriese durante 2 horas. Después, se lavaron las placas y se añadió anticuerpo de cabra antimurino, conjugado con HRP, a fin de detectar la Fc-TEM1 unida.

La Figura 5 muestra el mapeado de los dominios de unión a endosialina de la fibronectina (FN). Se evaluaron fragmentos obtenidos mediante proteólisis ("fragmentos proteolíticos") de la fibronectina (FN), así como fragmentos recombinantes derivados de la FN, en cuanto a su capacidad de facilitar la unión a TEM-1. Los fragmentos de FN evaluados comprenden: el fragmento aminoterminal de 70 kDa (N.º Cat. Sigma: F0287) (obtenido mediante digestión, con catepsina D, de la fibronectina); el fragmento de 30 kDa de unión a la heparina (N.º Cat. Sigma: F9911) y el fragmento de 45 kDa de unión a la gelatina (N.º Cat. Sigma: F0162) (ambos obtenidos mediante digestión, con tripsina, del fragmento de 70 kDa); el fragmento de 120 kDa que contiene el dominio de fijación a células ("el fragmento de 120 kDa"); y dos fragmentos recombinantes: Fn2, que contiene los primeros 7 dominios de tipo III de la FN, y Fn4, que contiene el sitio de puentes disulfuro intercatenarios y el dominio de unión a la  $\alpha 4 \beta 1$ -integrina. El diagrama de la estructura de la FN se ha adaptado de Wierzbicka-Patynowski *et al.* (2003) *J. Cell Sci.*, 116:3269-76.

La Figura 6 ilustra la unión de la Fc-TEM1 recombinante a EMP y a la fibronectina en presencia de inhibidores. M4 es un anticuerpo humanizado anti-endosialina humana, mientras que rbtTEM1 es un anticuerpo de conejo anti-endosialina humana. La prueba se llevó a cabo conforme a lo indicado en la Figura 4, salvo que se añadieron anticuerpos a fin de medir la capacidad de desbaratar o de bloquear la unión de la Fc-TEM1 a la FN. Como se muestra en la figura, M4 fue capaz de inhibir la unión de la Fc-TEM1 a la FN, mientras que un anticuerpo de control no específico (HulG) no fue capaz de ello.

La Figura 7 ilustra la unión de la endosialina a fragmentos de EMP (proteína de matriz extracelular), así como la inhibición de dicha unión por parte de compuestos inhibidores de la unión endosialina-EMP. En la Figura 5 se ilustran los fragmentos de la fibronectina. La Figura 7A muestra la unión a fragmentos de proteína obtenidos de FN nativa. La Figura 7B muestra la unión a fragmentos de proteína obtenidos de FN desnaturalizada. Para las Figuras 7A y 7B, se revistió una placa de ELISA de fragmento de FN, en las concentraciones indicadas. Para detectar las proteínas unidas intactas, se usó un anticuerpo policlonal anti-FN, y después, se añadió un anticuerpo secundario de cabra antimurino conjugado con HRP. Se añadió Fc-TEM1 (1,25 µg/ml) y se dejó que se uniese durante 2 horas. Después, se lavaron las placas y se añadió anticuerpo de cabra antimurino conjugado con HRP, a fin de detectar la Fc-TEM1 unida. En la Figura 7B, la barra rayada (Fc-TEM1-nativa) representa la unión de Fc-TEM1 a la FN no desnaturalizada. Como se observa, la endosialina se une a la región N-terminal de la fibronectina, puesto que se detectó una unión escasa, o nada de unión, a los fragmentos FN-2, FN-4 o de 120 kDa. Los anticuerpos policlonales anti-fibronectina se unieron a todos los fragmentos. Las Figuras 7C y 7D ilustran la unión de la Fc-TEM1 al fragmento de 70 kDa de la FN, así como la inhibición de la interacción por parte de los compuestos inhibidores de la unión endosialina-EMP. Se recubrió una placa de ELISA de la proteína FN entera, y del fragmento de 70 kDa de la proteína FN, a una concentración fija de ~15 nmol/pocillo en ambos casos. Se preincubó Fc-TEM1 (1,25 µg/ml) a 4 °C durante 1 hora, con cantidades crecientes de anticuerpo M4 anti-endosialina o de IgG isotipo de control. Se añadieron complejos de Fc-TEM1/M4 (Figura 7C) o de Fc-TEM1/IgG (Figura 7D) a los pocillos recubiertos de FN y de fragmento de 70 kDa, y se incubaron dichos pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente. La proteína Fc-TEM1 unida se detectó mediante la adición de anticuerpo secundario de cabra antimurino conjugado con HRP.

La Figura 8 muestra un cambio de morfología celular en una mezcla de proteínas gelatinosas (que se comercializa con el nombre comercial MATRIGEL [BD Biosciences]), tras la expresión de la endosialina. Se sembraron  $8 \times 10^4$  células CHO-K1 o CHO-TEM1 en una placa de 96 pocillos recubierta de MATRIGEL e incubada a 37 °C. Tras incubación durante toda la noche, se fotografiaron las células para realizar un examen macroscópico de la formación de túbulos.

La Figura 9 muestra la unión celular a los fragmentos de EMP, mediada por la endosialina. Se transfectaron células CHO (células ováricas de hámster chino) con un vector que expresa la endosialina o ADNc "mock" (ADNc simulado). Se confirmó que dichas células expresaban la endosialina de superficie celular (CHOTEM1), mientras que las células transfectadas con la simulación (CHOK1) no la expresaban. Figura 9A: se añadieron células CHO a una placa de 96 pocillos previamente revestida que contenía diversas proteínas de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Se dejó que las células se adhiriesen durante 1 hora a 37 °C, y se lavaron los pocillos a fondo, a fin de retirar las células que no estuviesen unidas firmemente. La cantidad de células unidas se determinó mediante el Ensayo luminiscente de viabilidad celular CELLTITER-GLO. Abreviaturas: Col, colágeno; FN, fibronectina; LN, laminina; TN, tenascina; VN, vitronectina; Neg, seroalbúmina bovina. Figura 9B: se transfectaron células CHO (células ováricas de hámster chino) con un vector que expresa la endosialina o ADNc simulado. Se confirmó, mediante análisis con FACS, que dichas células expresaban la endosialina de superficie celular (CHOTEM1), mientras que las células transfectadas con la simulación (CHOK1) no la expresaban. Después, se analizó la capacidad de las células para unirse a la EMP fibronectina, por sí solas o en combinación con un anticuerpo M4 anti-endosialina o con una IgG de control. La Figura 9B muestra que el anticuerpo anti-endosialina M4 reduce la adhesión celular a la FN, mediada por endosialina. Se preincubaron células ( $1,5 \times 10^5$ ) durante 1 hora a 4 °C con el anticuerpo M4 (100 µg/ml) o con un anticuerpo IgG isotipo de control (100 µg/ml). Figura 9C: se analizó la capacidad de las células de unirse a la totalidad de la FN (la longitud completa de la FN) o a fragmentos de la FN. Como se muestra en la Figura 9A, la cantidad de células CHO-TEM1 adherentes fue 6 veces mayor que la cantidad de células CHO-K1 parentales en los pocillos revestidos de FN. No se observaron diferencias significativas entre la adhesión de las células CHO-K1 y de las células CHO-TEM1 en superficies revestidas de laminina o de vitronectina, mientras que la adhesión a los colágenos y a la tenascina fue demasiado débil para poder evaluar la existencia de diferencias significativas (Figura 9A). Tras pretratar las células CHO-TEM1 con anticuerpo M4, se observó una reducción del 50% en la adhesión celular dependiente de TEM1-FN, mientras que el anticuerpo IgG de control no tuvo efecto alguno (Figura 9B). El tratamiento con anticuerpo M4 no afectó a la adhesión celular dependiente de FN, independiente de endosialina (adhesión de referencia) de las células CHO-K1 parentales. En las células CHO-TEM1 aumentó de 3 a 5 veces la adhesión a los fragmentos de 70 kDa y de 30 kDa de la FN, en comparación con la adhesión de las células CHO-K1 parentales, mientras que no se observó adhesión significativa alguna a los fragmentos de 45 kDa o Fn2. Las células CHO-TEM1 se unieron a MATRIGEL cinco veces mejor (más) que las células CHO-K1 (Figura 9C).

La Figura 10 muestra la identificación de los compuestos inhibidores de la unión endosialina-EMP colágeno. Se transfectaron células CHO con un vector que expresa la endosialina o ADNc simulado. Se confirmó que dichas células expresaban la endosialina de superficie celular (CHOTEM1), mientras que las células transfectadas con la simulación (CHOK1) no la expresaban. Después, se analizó la capacidad de las células para unirse a la EMP colágeno de tipo I (COL I), por sí solas o en combinación con un anticuerpo M4 anti-endosialina o con una IgG de control. Como se observa, la sobreexpresión de la endosialina ocasiona una mayor unión celular al COL I, que puede ser bloqueada por inhibidores de la endosialina tales como el anticuerpo M4, a diferencia de la molécula (IgG) de control, que no puede. El anticuerpo RbtTEM1 también suprimió la unión de la Fc-TEM1 al COL I (no se muestran los datos).

La Figura 11 muestra la unión celular a la EMP colágeno, mediada por la endosialina. Se transfectaron células CHO con un vector que expresa la endosialina o ADNc simulado. Se confirmó que dichas células expresaban la endosialina de superficie celular (CHOTEM1), mientras que las células transfectadas con la simulación (CHOK1) no la expresaban. Entonces, se analizó la capacidad de las células para unirse a la EMP colágeno de tipo I. Como se muestra, la sobreexpresión de endosialina ocasiona una mayor unión celular al COL I.

La Figura 12 ilustra la mediación de la migración celular por parte de la endosialina, y la inhibición de dicha migración por parte del anticuerpo anti-endosialina M4. Se determinó la capacidad del anticuerpo M4 para inhibir la migración de las células CHO-TEM1 y CHO-K1 a través de las membranas recubiertas de MATRIGEL (Figura 12A) o de FN (Figura 12B). Se añadieron las células a la cámara superior y se dejó que migrasen durante 48 horas a 37 °C. Se retiró la membrana y se determinó el número de células que habían migrado; para ello, se usó el ensayo luminiscente de viabilidad celular CELLTITER-GLO. Conforme a lo que se indica en las figuras, se trataron células con M4 o con IgG isotipo de control durante todo el experimento. Como se ilustra en la Figura 12A, las células CHO-K1 mostraron una migración celular modesta, mientras que las células CHO-TEM1 mostraron una migración celular más de 10 veces mayor. El tratamiento con anticuerpo M4 suprimió la migración celular de las células CHO-TEM1; no así el tratamiento con IgG de control. Se observaron resultados similares en experimentos de migración en los que se usaron cámaras Transwell© recubiertas con FN (Figura 12B).

La Figura 13 muestra la promoción, mediante endosialina, de las rutas celulares. Se transfectaron células CHO con un vector que expresa la endosialina o ADNc simulado. Se confirmó que dichas células expresaban la endosialina de superficie celular (CHOTEM1), mientras que las transfectadas con la simulación (CHOK1) no la expresaban. Se

analizó la capacidad de las células para promover rutas celulares. Una de tales rutas es la ruta de la MMP9, que desempeña una función en la migración celular. Como se indica, la sobreexpresión de la endosialina ocasiona una mayor actividad de la MMP-9, a diferencia de lo que ocurre en las células de control.

5 La Figura 14 muestra el efecto que tiene, sobre la activación de la integrina  $\beta$ , bloquear la endosialina. Se transfectaron células HEK293 (una línea de células embrionarias de riñón humano) con un vector que expresa la endosialina o ADNc simulado. Se confirmó que dichas células expresaban la endosialina de superficie celular (293TEM1), mientras que las células transfectadas con la simulación (293T) no la expresaban. Se analizó la capacidad de las células para promover rutas celulares. Una de tales rutas es la ruta de las integrinas, que desempeña una función en la migración celular. Como se observa, la sobreexpresión de la endosialina ocasiona una mayor actividad de la integrina  $\beta$ 1 (Figura 14B), a diferencia de lo que ocurre en las células de control; en cambio, el efecto directo sobre la expresión de la  $\beta$ 1 de superficie celular no cambia (Figura 14A). El tratamiento de las células con el inhibidor de la endosialina anticuerpo M4 suprimió la actividad de las integrinas; en cambio, no se observó efecto alguno sobre los niveles en la superficie celular (Figura 14B). Estos datos muestran que usando inhibidores de la endosialina se puede suprimir la función de las integrinas en células que expresan la endosialina.

15 La Figura 15 ilustra que el anticuerpo M4.1 reconoce a la TEM-1 no reducida humana en células CHO-TEM-1 y en pericitos primarios humanos, pero que no reconoce a la TEM-1 murina en células 2H11 de ratón. En cambio, el anticuerpo policlonal de conejo anti-TEM-1 humana (rabPAb TEM-1) reconoce a la TEM-1 humana en células CHO-TEM-1 y en pericitos humanos, y también a la TEM-1 murina en células 2H11 de ratón. Ni el M4.1 ni el rabPAb TEM-1 reaccionaron contra lisados de células CHO-K1 parentales, ni de células NS0 o MS1 murinas, a raíz de la ausencia de expresión de la TEM-1 en dichas células. Únicamente el rabPAb TEM-1 reaccionó contra la TEM-1 reducida humana, aunque en menor grado en comparación con el caso de la TEM-1 no reducida.

#### Descripción detallada

En la especificación y en las reivindicaciones se usan diversos términos relacionados con aspectos de la presente invención. A menos que se indique de otro modo, se debe dar a dichos términos el significado que tienen ordinariamente en este campo del conocimiento. Otros términos, definidos específicamente, se deben entender de manera acorde con la definición de ellos que aquí se proporciona.

Debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos que se emplean aquí en particular, puesto que, por supuesto, pueden variar. Asimismo, debe entenderse que la terminología aquí empleada se usa con la única finalidad de describir realizaciones concretas, y que no debe interpretarse que limite en modo alguno el ámbito de la presente invención.

Tal y como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “uno”, “una”, “el” y “la” engloban también las formas plurales, a menos que se desprenda de otro modo del contenido. Por ejemplo, cuando aquí se hace referencia a “una célula”, ello comprende también una combinación de dos o más células, y así en otros casos en general.

35 Cada intervalo aquí citado comprende todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos, así como los numerales concretos en ellos contenidos.

En este contexto, el término “aproximadamente” (o “aproximado” o “alrededor de unos” o “en torno a”, etc.) se usa al hacer referencia a un valor medible como, por ejemplo, una cantidad, una duración en el tiempo, y similares, y se debe entender que engloba variaciones del  $\pm 20\%$  o del  $\pm 10\%$ , más preferiblemente del  $\pm 5\%$ , aún más preferiblemente del  $\pm 1\%$ , e incluso más preferiblemente del  $\pm 0,1\%$ , respecto del valor especificado, dado que tales variaciones resultan apropiadas para la realización/puesta en práctica de los métodos aquí descritos.

45 “Ensayo específico de endosialina” (ESA, por sus siglas en inglés) se refiere a ensayos o pruebas que pueden usarse para identificar compuestos que pueden desbaratar, directa o indirectamente, la expresión de la endosialina o la actividad biológica que conduce a una modificación de la unión directa o indirecta de las células que expresan la endosialina o de la endosialina en sí a las EMP, mediante mecanismos mediados por la endosialina o por una integrina, o que pueden modificar las rutas endógenas celulares (tales como, entre otras posibles, las de las metaloproteasas de la matriz [MMPs]) y/o la proliferación celular o la supervivencia de las células.

50 “Polinucleótido” y su sinónimo conocido como “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico”, se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar, o ARN o ADN modificado(s). El término “polinucleótidos” comprende, entre otras posibilidades, ADN de cadena única y de cadena doble, ADN que sea una mezcla de regiones de cadena única y de cadena doble, ARN de cadena única y de cadena doble, ARN que sea una mezcla de regiones de cadena única y de cadena doble, y moléculas híbridas que comprendan ADN y ARN que pueden ser de cadena única o, más habitualmente, de cadena doble, o una mezcla de regiones de cadena única y de cadena doble. Además, “polinucleótido” se refiere a regiones de cadena triple que comprendan ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido comprende además ADN o ARN que contengan una o más bases modificadas y ADN o ARN con esqueletos modificados en aras de una mayor estabilidad o por otras razones. Cuando aquí se hace referencia a bases “modificadas”, se entiende que ello incluye, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales como, por ejemplo, inosina. Se pueden efectuar muy diversas

modificaciones al ADN y al ARN; por ello, el término “polinucleótido” comprende también formas química, enzimática o metabólicamente modificadas de polinucleótidos, como los que se encuentran habitualmente en la naturaleza, así como las formas químicas del ADN y del ARN que son características de los virus y de las células. “Polinucleótido” comprende asimismo cadenas de ácidos nucleicos relativamente cortas, que a menudo se denominan “oligonucleótidos”.

Un “vector” es un replicón como, por ejemplo, un plásmido, fago, cósmido o virus en el que se puede insertar operativamente otro segmento de ácido nucleico para poder lograr la replicación o la expresión de dicho segmento.

“Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan aquí como sinónimos para referirse a un polímero de residuos aminoácido. Dichos términos son aplicables a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácido son un compuesto químico artificial mimético de un aminoácido correspondiente que se da de forma natural, así como a polímeros de aminoácidos que se dan de forma natural y a polímeros de aminoácidos que no se dan de forma natural. “Polipéptidos” comprende las variantes modificadas conservadoramente. Los expertos en la materia saben que las sustituciones, deleciones o adiciones en la secuencia de un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido o una proteína que alteren, añadan o eliminen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada son una “variante modificada conservadoramente”, en la que la alteración conduce a la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Son bien conocidas, en este campo de la técnica, las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes conservadoramente modificadas son adicionales a las variantes polimórficas, a los homólogos inter-especies y a los alelos de la presente invención, y no los excluyen.

El término “expresar”, “expresado/a/s”, o “expresión” de una molécula de ácido nucleico, se refiere aquí a la biosíntesis de un producto de un gen. Dicho término engloba la transcripción de un gen a ARN.

Por ejemplo, aunque de ninguna manera se debe entender como ejemplo limitador, un gen regulador tal como un ácido nucleico antisense o un ácido nucleico interferente puede expresarse, mediante transcripción, como ARN antisense o como ARNi o ARNsh. El término engloba también la traducción del ARN en uno o más polipéptidos, y engloba todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales que se dan de forma natural.

Se entiende que una célula ha sido “transformada” o “transfectada” por ácidos nucleicos exógenos o heterólogos como, por ejemplo, ADN, cuando dicho ADN ha sido introducido en la célula. El ADN transformador puede integrarse o no (mediante enlaces covalentes) en el genoma de la célula. En las células de procariontes, levaduras y mamíferos, por ejemplo, el ADN transformador puede mantenerse en un elemento episomal como, por ejemplo, un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula transformada de manera estable, o “célula estable”, es una en la que el ADN transformador se ha integrado en un cromosoma, de manera que es heredado por las células hijas mediante la replicación cromosómica. Dicha estabilidad es demostrada por la capacidad de la célula eucariótica de establecer líneas celulares o clones que comprendan una población de células hijas que contienen el ADN transformador. Un “clon” es una población de células derivadas de una única célula o ancestro común, mediante mitosis. Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que es capaz de crecer de manera estable *in vitro* durante muchas generaciones.

De la manera en que se usa aquí, el término “compuesto de prueba” se refiere a una molécula purificada, molécula sustancialmente purificada, o moléculas, que son un componente o más de un componente de una mezcla de compuestos o de una mezcla de un compuesto con cualquier otro material que se pueda utilizar. Los compuestos de prueba pueden ser compuestos químicos orgánicos o inorgánicos, o biomoléculas, así como todos los fragmentos, análogos, homólogos, conjugados y derivados de lo anterior. El término “biomoléculas” comprende proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, monosacáridos, polisacáridos, así como todos los fragmentos, análogos, homólogos, conjugados y derivados de lo anterior. Los compuestos de prueba pueden ser de origen natural o sintético, y pueden aislarse de o purificarse a partir de sus fuentes naturales, o bien, pueden sintetizarse *de novo*. Los compuestos de prueba pueden estar definidos en cuanto a su estructura o su composición, o pueden no estar definidos. El compuesto puede ser un producto aislado de estructura desconocida, una mezcla de varios productos conocidos, o una composición no definida que comprenda uno o más compuestos. Son ejemplos de composiciones no definidas: extractos celulares y tisulares, medio de crecimiento en el que se han cultivado células procariontes, células eucarióticas y arqueobacterias, caldos de fermentación, bibliotecas de expresión de proteínas y similares.

El término “knockdown” se refiere a una célula u organismo en el que hay una expresión reducida de uno o más genes. Como sabrán los expertos en la materia, una “célula knockdown” muestra como mínimo una reducción de alrededor de un 50% de la expresión; preferiblemente, muestra como mínimo una reducción de alrededor de un 67% de la expresión; y más preferiblemente, muestra como mínimo una reducción de alrededor de un 75% de la expresión, aunque son posibles reducciones mayores, incluidas reducciones de como mínimo alrededor de un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o una reducción aún mayor, de la expresión.

“Inhibir” o “inhibición” o “interferir” significa reducir, disminuir, bloquear, prevenir, retrasar, suprimir, inactivar, desensibilizar, detener o regular a la baja la actividad biológica o la expresión de un gen, del producto de un gen (por

ejemplo, un polipéptido), o de una ruta de interés. En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la inhibición de la expresión o de la actividad biológica de una proteína o de una ruta de interés (por ejemplo, la endosialina o una ruta de migración celular), se refiere a una reducción (inhibición o regulación a la baja) de aproximadamente más de un 50% hasta un 99% aproximadamente, y más específicamente, de aproximadamente un 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más. La inhibición puede ser directa, es decir, actuar sobre la molécula o ruta de interés en sí, o indirecta, es decir, actuar sobre una molécula o ruta que afecte a la molécula o ruta de interés.

El término “recombinante”, cuando se usa en referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector ha sido modificado/a mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o de una proteína heteróloga, o mediante la alteración de un ácido nucleico nativo o de una proteína nativa, o bien, indica que la célula se ha derivado de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que, de otro modo, se expresan anormalmente, se expresan menos o no se expresan en absoluto.

“Cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se usan aquí como sinónimos, y se refieren a una cantidad de un anticuerpo, de un fragmento de unión al antígeno o de una composición, como los/las que aquí se describen, eficaz para conseguir un resultado biológico concreto como, por ejemplo, entre otros posibles, los resultados biológicos que se presentan, describen o ejemplifican en la presente invención. Dichos resultados pueden comprender, por ejemplo, el tratamiento de enfermedades asociadas a angiogénesis o a neovascularización, conforme a lo que determine mediante cualquier medio de este campo de la técnica que se estime adecuado.

Tal y como aquí se usan, los términos “medir” o “determinar” se refieren a cualquier determinación cualitativa o cuantitativa.

“Ligando de la endosialina” se refiere a cualquier compuesto químico, biomolécula, complejo, o análogo, homólogo o derivado de lo anterior, capaz de unirse a, interactuar con, estimular y/o alterar la expresión de la endosialina.

Salvo si aquí se indica de otro modo, “sujeto” o “paciente” se usan como sinónimos, y se refieren a mamíferos, como, por ejemplo, pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales de experimentación como, por ejemplo, conejos, perros, gatos, ratas, ratones y otros animales. Por ello, “sujeto” o “paciente”, tal como aquí se usan, significa cualquier paciente o sujeto que es un mamífero y al que se pueden administrar las composiciones de la invención.

“Angiogénesis” se refiere a la formación de vasos sanguíneos nuevos.

“Neovascularización” se refiere a una proliferación patológica de vasos sanguíneos nuevos en un tejido o tejidos u órgano u órganos que normalmente no contienen vasos sanguíneos; o bien, se refiere a una proliferación patológica de vasos sanguíneos de un tipo diferente o en una cantidad diferente a la normal en un tejido u órgano concreto.

“Epítipo” se refiere a un determinante inmunológico de un antígeno que sirve de sitio de unión de un anticuerpo. Tal y como aquí se usa, el término “epítipo conformacional” se refiere a un epítipo discontinuo formado por una relación espacial entre los aminoácidos de un antígeno, diferente a una serie sucesiva de aminoácidos.

“Aislado/a/s” significa “alterado/a/s por la mano del hombre”, a diferencia del estado natural. Si una molécula o una composición se da en la naturaleza, se ha “aislado” la misma si ha sido modificada, retirada de su entorno original, o ambas cosas. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de manera natural en una planta o animal vivos, no se ha “aislado”; sin embargo, ese mismo polinucleótido o polipéptido, si ha sido separado de los materiales con los que coexiste en su estado natural, ha sido “aislado” conforme al significado que aquí se le da a ese término.

“Sustancialmente iguales”, en relación a secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, significa que existe una igualdad de al menos el 65%, aproximadamente, entre dos o más secuencias (son idénticas entre sí en al menos un 65% aproximadamente). Preferiblemente, el término se refiere a una igualdad de al menos el 70%, aproximadamente, entre dos o más secuencias; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 75%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 80%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 85%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 90%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 91%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 92%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 93%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 94%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 95%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 96%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 97%, aproximadamente; más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 98%, aproximadamente; y más preferiblemente, a una igualdad de al menos el 99%, aproximadamente, o superior.

Se ha descubierto, de conformidad con la presente invención, que la endosialina interactúa de manera específica

con proteínas de la matriz extracelular, como, por ejemplo, la fibronectina o el colágeno. También se ha descubierto que dicha interacción promueve la migración celular y, además, que promueve y facilita la angiogénesis. Además, se ha descubierto que el desbaratamiento de la interacción entre la endosialina y las proteínas de la matriz extracelular puede suprimir la migración celular y suprimir la angiogénesis.

5 La inhibición de la expresión de la endosialina puede producirse a nivel de gen o a nivel de proteína.

Por ejemplo, la inhibición de la expresión de la endosialina puede comprender establecer como diana el ADN que codifica la endosialina, o establecer como diana el transcrito de ARNm del gen de la endosialina.

10 En este campo del conocimiento se conocen métodos de regulación de genes, y se usan en la práctica sin dificultad; todos ellos resultan adecuados para ser usados en la presente invención. Por ejemplo, en células creadas específicamente para expresar un transgén que codifica la endosialina (por ejemplo, SEC N.º ID: 1, 3 ó 5), el transgén puede ser sometido al control por parte de un promotor inducible. Los promotores inducibles adecuados para ser usados en la presente invención son conocidos por los expertos en la materia.

15 Los genes que codifican la endosialina pueden ser inhibidos usando diversas otras técnicas de silenciamiento postranscripcional de genes (silenciamiento de ARN). El silenciamiento de ARN comprende procesar el ARN de cadena doble (ARNds) mediante una enzima ARNasa basada en H ("Dicer" o "tipo Dicer") que lo escinda en fragmentos pequeños de 21-28 nucleótidos. Los productos de la escisión, que son ARNsi (ARN pequeño interferente) o ARNmi (micro-ARN), se incorporan a complejos proteínicos efectores que regulan la expresión génica de una manera específica de secuencia.

20 La interferencia del ARN (iARN) es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional mediado por ARN de cadena doble (ARNds); dicho mecanismo es diferente de los enfoques basados en moléculas antisense y ribozimas (véase Jain, *Pharmacogenomics* (2004) 5:239-42, para una revisión de la iARN y de los ARNsi). La interferencia del ARN resulta útil en un método para inhibir la expresión de la endosialina en una célula o en un animal, tal como un ser humano, mediante transformación de la célula; o bien, mediante administración, a un animal, de un ácido nucleico (por ejemplo, ARNds) que se hibride (en condiciones astringentes) con un gen que codifique la endosialina y que atenúe la expresión del gen diana. La interferencia del ARN proporciona ARNsh o ARNsi que comprende(n) varias secuencias que tienen como diana una o más regiones del gen de la endosialina. Se cree que las moléculas (ARNsh o ARNsi) de ARN de cadena doble (ARNds) dirigen la degradación específica de secuencia del ARNm en células de diversos tipos, tras primero ser procesadas por una enzima tipo ARNasa III llamada "DICER" (Bernstein E *et al.* (2001) *Nature* 409:363-366) que las divide en moléculas más pequeñas de ARNds compuestas de dos cadenas de 21 "nt" (nucleótidos), cada una de las cuales tiene un grupo 5'-fosfato y un grupo 3'-hidroxilo e incluye una región de 19 nt que es complementaria, con precisión, de la otra cadena, de manera que hay una región dúplex de 19 nt flanqueada por secuencias sobresalientes -3' de 2 nt. De este modo, la iARN es mediada por ARN cortos interferentes (ARNsi), que suelen comprender una región de cadena doble de aproximadamente 19 nucleótidos de longitud, con secuencias sobresalientes -3' de 1-2 nucleótidos en cada cadena, lo que conduce a una longitud total entre 21 y 23 nucleótidos aproximadamente. En las células de mamíferos, el ARNds de más de aproximadamente 30 nucleótidos suele inducir una degradación no específica del ARNm, mediante la respuesta del interferón. Sin embargo, en vez de inducir la respuesta del interferón, en las células de mamíferos la presencia de ARNsi conduce a un silenciamiento génico específico de secuencia.

40 Los vectores víricos o los vectores de ADN codifican el denominado "ARN tipo horquilla corto" (ARNsh, un ARN en forma de pequeña horquilla), que es procesado en el citoplasma celular de modo tal que se produce ARN corto interferente (ARNsi). En general, un ARN corto interferente (ARNsi) comprende un dúplex de ARN que, preferiblemente, tiene aproximadamente 19 pares de bases de longitud, y que opcionalmente comprende, asimismo, uno o dos secuencias sobresalientes o bucles de una sola cadena. Un ARNsi puede comprender dos cadenas de ARN hibridadas entre sí, o bien, puede comprender una sola cadena de ARN que incluya una porción autohibridante. Los ARNsi pueden incluir uno o más extremos de cadena libre, que pueden incluir grupos fosfato y/o hidroxilo. Por lo general, los ARNsi incluyen una porción que se hibrida en condiciones astringentes con un transcrito diana. Por lo general, una cadena del ARNsi (o la porción autohibridante del ARNsi) es complementaria, con precisión, de una región del transcrito diana, lo que significa que el ARNsi se hibrida con el transcrito diana sin un solo emparejamiento dispar (sin una sola "discordancia"). No obstante, es posible que no se logre una complementariedad perfecta; las discordancias que haya pueden estar situadas en los extremos del ARNsi o cerca de ellos.

55 Se ha demostrado que los ARNsi regulan a la baja la expresión génica cuando son transferidos al interior de células de mamíferos mediante métodos tales como transfección, electroporación (electropermeabilización), transfección mediada por liposomas catiónicos, o microinyección, o cuando se expresan en las células a través de cualquiera de diversos métodos basados en plásmidos. La interferencia del ARN usando ARNsi se trata en, por ejemplo, Tuschl (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:446-8; Yu J-Y *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:6047-52; Sui G *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:5515-20; Paddison *et al.* (2002) *Genes and Dev.*, 16:948-58; Brummelkamp *et al.* (2002) *Science*, 296:550-3, 2002; Miyagashi *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:497-500; y en Paul *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:505-8. Como se describe en esas y otras referencias bibliográficas, el ARNsi puede constar de dos cadenas individuales de ácido nucleico o de una sola cadena con una región autocomplementaria capaz de formar

una estructura tipo horquilla (tallo-bucle). Hay diversas variaciones en cuanto a la estructura, a la longitud, al número de discordancias, al tamaño de bucle, a la igualdad de los nucleótidos de las secuencias sobresalientes, etc., que permiten un silenciamiento génico eficaz desencadenado por ARNsi. Sin que en la presente invención deseemos avalar ninguna teoría en concreto, cabe señalar que se piensa que el procesado intracelular (por ejemplo, mediante DICER) de diversos precursores diferentes conduce a la producción de ARNsi capaz de mediar eficazmente el silenciamiento génico. Pueden establecerse como diana exones, y no intrones, y pueden seleccionarse secuencias complementarias a regiones comprendidas en la porción 3' del transcripto diana. Secuencias que contengan una proporción aproximadamente equimolar de los diferentes nucleótidos, evitando tramos en los que un único residuo esté repetido varias veces.

Así, los ARNsi pueden comprender moléculas de ARN que tengan una región de cadena doble de aproximadamente 19 nucleótidos de longitud, con secuencias sobresalientes -3' de 1-2 nucleótidos en cada cadena, lo que conduce a una longitud total entre 21 y 23 nucleótidos aproximadamente. En la manera en la que se usan en la presente invención, los ARNsi comprenden también diversas estructuras de ARN que pueden ser procesadas *in vivo* para generar dichas moléculas. Tales estructuras comprenden cadenas de ARN que contienen dos elementos complementarios que se hibridan entre sí para formar un tallo, un bucle, y opcionalmente una secuencia sobresaliente (preferiblemente, una secuencia sobresaliente 3'). Preferiblemente, el tallo tiene aproximadamente 19 pb de longitud, el bucle tiene unos 1-20 nt de longitud, más preferiblemente unos 4-10 nt de longitud, y en el caso más preferible unos 6-8 nt de longitud, y/o la secuencia sobresaliente tiene unos 1-20 nt de longitud, y más preferiblemente unos 2-15 nt de longitud. En ciertas realizaciones de la presente invención, el tallo tiene como mínimo 19 nucleótidos de longitud y puede tener hasta aproximadamente 29 nucleótidos de longitud. Los bucles de 4 o más nucleótidos tienen menor probabilidad de estar sujetos a limitaciones estéricas que los bucles más cortos que ellos y, por ello, pueden ser preferibles. La secuencia sobresaliente puede comprender un 5'-fosfato y un 3'-hidroxilo. La secuencia sobresaliente puede comprender, aunque no es necesario que los comprenda, varios residuos U; por ejemplo, entre 1 y 5 residuos U. Los ARNsi clásicos como los que se han descrito hasta aquí desencadenan la degradación de los ARNm que tienen como diana, por lo que, además, reducen el porcentaje de síntesis de proteínas. Además de los ARNsi que actúan a través de la ruta clásica, ciertos ARNsi que se unen a la región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) 3' de un transcripto de la plantilla pueden inhibir la expresión de una proteína codificada por el transcripto de la plantilla, mediante un mecanismo relacionado con la interferencia de ARN clásica, pero diferente de la misma; por ejemplo, reduciendo la traducción del transcripto, en vez de reduciendo la estabilidad de éste. A tales ARN se les denomina microARN (ARNmi) y suelen tener entre 20 y 26 nucleótidos de longitud, aproximadamente; por ejemplo, 22 nt de longitud. Se cree que se derivan de precursores de mayor tamaño denominados ARN temporales pequeños (ARNst) o precursores del ARNm, y que suelen tener aproximadamente 70 nt de longitud, con un bucle de unos 4-15 nt (Grishok *et al.* (2001) *Cell*, 106:23-4; Hutvagner *et al.* (2001) *Science*, 293:834-8; Ketting *et al.* (2001) *Genes Dev.*, 15:2654-9). Se han identificado ARN endógenos de este tipo en diversos organismos, mamíferos incluidos; parece desprenderse, de ello, que este mecanismo de silenciamiento de genes postranscripcional puede estar ampliamente extendido (Lagos-Quintana *et al.* (2001) *Science*, 294:853-8, 2001; Pasquinelli (2002) *Trends Gen.*, 18:171-3). Se ha demostrado que, en células de mamíferos, los microARN bloquean la traducción de transcriptos diana que contienen sitios diana (Zeng *et al.* (2002) *Mol. Cell*, 9:1327-33).

Es posible que los ARNsi tales como los ARNm que se dan naturalmente o como los ARNm artificiales (es decir, que son diseñados por los seres humanos) que se unen dentro de la UTR 3' (o en otra parte dentro de un transcripto diana) y que inhiben la traducción, toleren un número mayor de discordancias en el dúplex ARNsi/plantilla, y que, en particular, toleren discordancias comprendidas dentro de la región central del dúplex. De hecho, existen evidencias de que algunas discordancias pueden resultar deseables, o necesarias, puesto que con frecuencia los ARNst que se dan en la naturaleza tienen dichas discordancias, al igual que las tienen los ARNm que inhiben la traducción *in vitro*. Por ejemplo, cuando se hibridan con el transcripto diana, tales ARNsi comprenden, con frecuencia, dos tramos de complementariedad perfecta, separadas por una región de discordancia. Son posibles diversas estructuras. Por ejemplo, el ARNm puede incluir varias zonas de no igualdad (zonas de discordancia). No es necesario que las zonas de no igualdad (zonas de discordancia) sean simétricas, en el sentido de que tanto la diana como el ARNm incluyan nucleótidos no emparejados. Por lo general, los tramos de complementariedad perfecta tienen como mínimo 5 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 6, 7 o más nucleótidos de longitud), mientras que las regiones de discordancia pueden tener, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos de longitud.

Las estructuras tipo horquilla diseñadas para imitar a los ARNsi y a los precursores del ARNm se procesan intracelularmente, de manera que se forman moléculas capaces de reducir o de inhibir la expresión de los transcriptos diana (McManus *et al.* (2002) *RNA* 8:842-50). Dichas estructuras tipo horquilla, que se basan en los ARNsi clásicos que comprenden dos cadenas de ARN que forman una estructura dúplex de 19 pb, se clasifican como horquillas de clase I o de clase II. Las horquillas de clase I incorporan un bucle en el extremo 5' o 3' de la cadena de ARNsi antisense (es decir, la cadena complementaria del transcripto diana cuya inhibición se desea lograr), pero, por lo demás, son idénticas a los ARNsi clásicos. Las horquillas de clase II se parecen a los precursores del ARNm en el sentido de que incluyen una región dúplex de 19 nt y un bucle en el extremo 3' o 5' de la cadena antisense del dúplex, además de una o más discordancias de nucleótidos en el tallo. Estas moléculas se procesan intracelularmente, de manera tal que forman pequeñas estructuras dúplex de ARN capaces de mediar el silenciamiento. Parece que ejercen sus efectos mediante la degradación del ARNm diana, y no mediante la represión de la traducción, a diferencia de los ARNm y ARNsi que se dan de manera natural, que se cree hacen esto

último.

Por eso, resulta evidente que un conjunto diverso de moléculas de ARN que contenga estructuras dúplex será capaz de mediar el silenciamiento mediante diversos mecanismos. Se considera que es un ARNsi cualquier ARN de esas características que tenga una porción que se una a un transcrito diana y que reduzca su expresión, bien desencadenando la degradación, bien inhibiendo la traducción, o por otros medios; toda estructura que genere un ARNsi de esas características (es decir, que sirva de precursor del ARN) resulta útil para poner en práctica la presente invención.

Otro método de interferencia del ARN consiste en el uso de ARN tipo horquilla cortos (ARNsh). Un plásmido que contiene una secuencia de ADN que codifica una secuencia de ARNsi concreta deseada se hace llegar al interior de una célula diana mediante transfección o mediante una infección mediada víricamente. Ya dentro de la célula, dicha secuencia de ADN es transcrita continuamente de modo que forma moléculas de ARN que forman un bucle sobre sí mismas para conformar estructuras tipo horquilla, mediante emparejamiento intramolecular de bases. Una vez procesadas por la célula, dichas estructuras tipo horquilla son equivalentes a las moléculas de ARNsi transfectadas y son usadas por la célula para mediar la iARN (interferencia del ARN) de la proteína deseada. El uso de ARNsh presenta una ventaja frente a la transfección con ARNsi, ya que dicho uso puede conducir a una inhibición estable y duradera de la expresión de la proteína. La inhibición de la expresión de la proteína por parte de los ARNsi transfectados es un fenómeno transitorio que no se produce durante períodos de tiempo superiores a unos cuantos días, aunque, en algunos casos, esto último puede resultar preferible y deseable. En los casos en los que resultan necesarios períodos más prolongados de inhibición de la proteína, resulta preferible la inhibición mediada por ARNsh. El uso de ARNsh es particularmente preferido. Por lo general, los vectores que codifican ARNsi son constructos que comprenden un promotor, una secuencia en la orientación "sense" del gen diana (es decir, en el mismo sentido que la secuencia del gen diana) que se quiere silenciar, un espaciador, una secuencia antisense (respecto de la secuencia del gen diana), y un terminador.

La inhibición de la expresión de la endosialina puede también efectuarse mediante otros medios que son conocidos en este campo del conocimiento y que se pueden poner en práctica sin dificultad. Por ejemplo, se pueden usar ácidos nucleicos antisense. Los transcritos antisense del ARN tienen una secuencia de bases complementaria a parte o la totalidad de los otros transcritos que hay en la misma célula. Se ha demostrado que dichos transcritos modulan la expresión génica mediante diversos mecanismos, incluida la modulación del "splicing" (corte y empalme) del ARN, la modulación del transporte del ARN y la modulación de la traducción del ARNm (Denhardt (1992) *Ann. N Y Acad. Sci.*, 660:70-6, 1992; Nellen *et al.* (1993) *Trends Biochem. Sci.*, 18:419-23; y Baker *et al.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta.*, 1489: 3-18). Por eso, la inhibición de la endosialina en una célula puede lograrse expresando una molécula de ácido nucleico antisense dentro de la célula.

Por lo general, los ácidos nucleicos antisense son ácidos nucleicos de una sola cadena (ADN, ARN, ADN modificado o ARN modificado), complementarios de una porción de un ácido nucleico diana (por ejemplo, un transcrito de ARNm) y, por ello, son capaces de unirse a la diana para formar un dúplex. Habitualmente, son oligonucleótidos de 15 a 35 nucleótidos de longitud, pero pueden tener desde 10 hasta aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. La unión suele reducir o inhibir la función del ácido nucleico diana; por ejemplo, la de un gen que codifique la endosialina. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisense pueden bloquear la transcripción cuando se unen al ADN genómico, inhibir la traducción cuando se unen al ARNm, y/o conducir a la degradación del ácido nucleico. La inhibición de la expresión de la endosialina puede lograrse mediante la administración de ácidos nucleicos peptídicos o ácidos nucleicos antisense que comprendan secuencias complementarias a las del ARNm que codifica la proteína endosialina. La tecnología antisense y sus aplicaciones son bien conocidas en este campo del conocimiento y se describen en Phillips (ed.) *Antisense Technology, Methods Enzymol.*, 2000, Volúmenes 313 y 314, Academic Press, San Diego, así como en las referencias bibliográficas allí mencionadas. Véase también Crooke (ed.) "Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications" (1ª Edición) Marcel Dekker y las referencias bibliográficas allí mencionadas.

Se pueden sintetizar oligonucleótidos antisense que tengan una secuencia de bases complementaria a una porción de cualquier transcrito de ARN presente en la célula. Los oligonucleótidos antisense pueden modular la expresión génica mediante diversos mecanismos, incluida la modulación del splicing del ARN, la modulación del transporte del ARN y la modulación de la traducción del ARNm. Diversas propiedades de los oligonucleótidos antisense, incluidas su estabilidad, toxicidad, distribución en los tejidos, captación por las células y afinidad de su unión, pueden ser alteradas mediante modificaciones químicas que incluyen: (i) reemplazo del esqueleto fosfodiéster (por ejemplo, ácido nucleico peptídico, fosforotioato-oligonucleótidos y fosforamidato-oligonucleótidos); (ii) modificación de la base azucarada (por ejemplo, 2'-O-propilribosa y 2'-metoxietoxirribosa); y (iii) modificación del nucleósido (por ejemplo, C-5 propinil U, C-5 tiazol U, y fenoxazina C) (Wagner (1995) *Nat. Medicine*, 1:1116-8; Varga *et al.* (1999) *Immun. Lett.*, 69:217-24; Neilsen (1999) *Curr. Opin. Biotech.*, 10:71 -5; y Woolf (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:1763-9).

La inhibición de la expresión del gen de la endosialina también puede efectuarse mediante el uso de ribozimas. Se ha demostrado que ciertas moléculas de ácido nucleico denominadas ribozimas o desoxirribozimas catalizan la escisión, específica de secuencia, de las moléculas de ARN. El lugar de la escisión ("sitio de escisión") viene determinado por el emparejamiento complementario de nucleótidos de la enzima de ARN o de ADN, con nucleótidos del ARN diana. Así, se pueden diseñar enzimas de ARN y de ADN que escindan cualquier molécula de ARN, con lo

que aumenta la velocidad de degradación de dicho ARN (Cotten *et al.* (1989) *EMBOJ.*, 8:861-6; y Usman *et al.* (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1:527-33). También se usan rutinariamente ribozimas "hammerhead" (ribozimas en forma de cabeza de martillo) en la regulación génica (Lyngstadaas (2001) *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 12:469-78).

5 En aspectos preferidos de la presente invención, las células que se establecen como diana pueden ser transformadas de manera específica mediante ácidos nucleicos silenciadores de la transcripción tales como ARNsh o ARNsi, o pueden ser transformados mediante vectores que codifican dichos ácidos nucleicos, de modo tal que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico inhibitoras. La transformación de las células puede llevarse a cabo conforme a cualquiera de los medios adecuados conocidos en este campo del conocimiento, incluidos los que aquí se describen y ejemplifican.

10 Los oligonucleótidos "decoy" (oligonucleótidos "señuelo") también son adecuados para regular la expresión de los genes que codifican la endosialina. En estudios clínicos llevados a cabo recientemente se ha analizado la capacidad de los oligonucleótidos decoy para secuestrar proteínas patógenas. Por lo general, los oligonucleótidos decoy contienen un elemento mejorador capaz de penetrar en las células; una vez dentro de las células, los oligonucleótidos decoy se unen a proteínas específicas de secuencia que se unen a ADN e interfieren en la transcripción (Fichou *et al.* (2006) *Trends Biotechnol.*, 24:563-70; Nakamura *et al.* (2002) *In Vivo*, 16:45-8; Tomita *et al.* (1997) *Exp. Nephrol.*, 5:429-34).

La regulación genética de la expresión de la endosialina puede también lograrse mediante "knockdown" (reducción de la expresión) del gen que codifica la endosialina. Como comprenderán los expertos en la materia, la secuencia del gen de la endosialina (de cualquier organismo de interés), por ejemplo, la SEC N.º ID: 1, 3 ó 5, se puede usar para generar moléculas de ácido nucleico y vectores con los que reducir la expresión del gen de la endosialina. En términos de sus secuencias, las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias reguladoras, y en particular, inhibitoras, que se derivan de las SEC N.º ID: 1, 3 y 5, incluyen variantes alélicas, homólogos y mutantes naturales de las SEC N.º ID: 1, 3 y 5. Dado que se espera que tales variantes y homólogos presenten ciertas diferencias en la secuencia de nucleótidos, la invención proporciona polinucleótidos aislados que tienen una igualdad de al menos un 60% aproximadamente, preferiblemente de al menos un 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 20 67%, 68%, 69% o 70% aproximadamente, más preferiblemente de al menos un 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% u 80% aproximadamente, aún más preferiblemente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, incluso más preferiblemente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, y en el caso más preferible 96%, 97%, 98% y 99% o más, con cualquier ácido nucleico reductor de la expresión, derivado de las SEC N.º ID: 1, 3 ó 5. A causa de la variación natural en la secuencia que es probable que exista entre genes que codifican dichas secuencias reguladoras en diferentes organismos, los expertos en la materia esperarían encontrar este nivel de variación y que, a la vez, se mantengan las propiedades singulares de los polinucleótidos knockdown (reductores de la expresión). Por lo tanto, dichas variantes y dichos homólogos se consideran sustancialmente iguales entre sí, y se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

35 Se pueden preparar moléculas de ácidos nucleicos knockdown mediante dos métodos generales: (1) pueden sintetizarse a partir de nucleótido-trifosfatos adecuados, o (2) pueden aislarse de fuentes biológicas. En ambos métodos se utilizan protocolos bien conocidos en este campo del conocimiento.

La disponibilidad de información sobre secuencias de nucleótidos (por ejemplo, la totalidad de la secuencia de ácidos nucleicos de la endosialina), tales como las SEC N.º ID: 1, 3 y 5, permite preparar, mediante síntesis de oligonucleótidos, una molécula de ácido nucleico aislada, conforme a la invención. Los oligonucleótidos sintéticos pueden prepararse mediante el método del fosforamidato empleado en el Sintetizador de ADN 38A de Applied Biosystems o en dispositivos similares. El constructo resultante puede purificarse mediante métodos conocidos en este campo del conocimiento, tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés). Una molécula de ADN sintético así construida puede entonces clonarse y amplificarse en un vector 45 adecuado.

Los ácidos nucleicos knockdown pueden mantenerse como ADN en cualquier vector de clonación adecuado. En algunos aspectos preferidos, los clones se mantienen en un plásmido vector de clonación/de expresión; cualquiera de los dos se puede propagar en una célula huésped (también denominada "hospedadora", o "host") procariótica o eucariótica adecuada.

50 Las moléculas de ácido nucleico knockdown comprenden ADNc, ADN genómico, ARN, y fragmentos de los mismos, que pueden ser de cadena única, de cadena doble o, incluso, de cadena triple. Por eso, la presente invención proporciona oligonucleótidos (cadenas sense o antisense de ADN o de ARN) que tienen secuencias capaces de hibridarse con al menos una secuencia de una molécula de ácido nucleico de la presente invención, y en particular, con las SEC N.º ID: 1, 3 ó 5. Tales oligonucleótidos son útiles como sondas para la detección de genes que codifican la endosialina, o para la regulación al alza o a la baja de la expresión de genes que codifican la endosialina en el momento de la traducción o antes de la traducción del ARNm en proteína. Métodos en los que se pueden utilizar oligonucleótidos o polinucleótidos como sondas para tales ensayos son, entre otros posibles: (1) hibridación *in situ*; (2) hibridación Southern (3) hibridación Northern; (4) reacciones de amplificación varias, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés).

Asimismo, conforme a la presente invención se presentan vectores y kits para la producción de células huésped transgénicas que comprenden un polinucleótido que codifica una secuencia reguladora para la inhibición de la expresión de la endosialina, o un homólogo, análogo o variante de dicho polinucleótido en orientación sense o antisense, o un constructo controlado por promotores específicos de célula o de tejido y/o por otras secuencias reguladoras. Tales vectores son adecuados para modular, y preferiblemente, para inhibir, la expresión de la endosialina.

Son células huésped adecuadas, entre otras posibles: células de plantas, células bacterianas, células de levaduras y otras células fúngicas, células de insectos y células de mamíferos que expresan la endosialina. Las células pueden transformarse neoplásicamente. Se prefieren más las células humanas.

Son conocidos por los expertos en la materia vectores para la transformación de una amplia gama de dichas células huésped. Dichos vectores pueden ser, por ejemplo: plásmidos, fagémidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BACs, por sus siglas en inglés), cromosomas artificiales de levaduras (YACs, por sus siglas en inglés), así como otros vectores bacterianos, vectores víricos y vectores de levaduras.

La región codificadora de una secuencia reguladora se puede colocar bajo el control de un promotor constitutivo potente; por ejemplo, los promotores de los siguientes genes: hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT, por sus siglas en inglés), adenosina desaminasa, piruvato quinasa, beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana, y otros. Además, muchos promotores víricos funcionan constitutivamente en células eucarióticas y son adecuados para su uso en la presente invención. Algunos de dichos promotores víricos son: promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), los promotores temprano y tardío del SV40, el promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV), las repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés) del virus de la leucemia de Maloney, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de Epstein-Barr (EBV), virus del sarcoma de Rous (RSV), y otros retrovirus, así como el promotor de la timidina quinasa del virus Herpes Simplex. Hay otros promotores que son conocidos por los expertos en la materia. En una realización, la región codificadora de la secuencia reguladora se coloca bajo el control de un promotor inducible tal como el promotor de las metalotioneínas, el promotor inducible mediante tetraciclina, el promotor inducible mediante doxiciclina, promotores que contienen uno o más elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE, por sus siglas en inglés), tales como la proteína quinasa R, las 2',5'-oligoadenilato sintetasas, los genes Mx, ADAR1, y similares. Los expertos en la materia conocen otros promotores inducibles adecuados.

Se pueden usar vectores knockdown (reductores de la expresión) para transformar diversas células que expresan la endosialina mediante secuencias de ácidos nucleicos reguladoras. En este campo del conocimiento se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en células, y pueden usarse para construir células recombinantes conforme a las diversas realizaciones de la invención. La técnica que se use debería hacer posible la transferencia estable de la secuencia génica heteróloga a la célula huésped, de modo que dicha secuencia génica heteróloga sea heredable y expresable por la prole de la célula huésped, y de modo, también, que no se desbaraten las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células receptoras. Algunas de las técnicas que se pueden usar son: transferencia cromosómica (por ejemplo, fusión de células, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas), métodos físicos (por ejemplo, transfección, fusión de esferoplastos, microinyección, electroporación, liposomas transportadores), transferencia de vectores víricos (por ejemplo, virus con ADN recombinante, virus con ARN recombinante), y similares (véase una descripción en Cline (1985) *Pharmac. Ther.*, 29:69-92).

Se pueden crear células knockdown con inhibición de la expresión de la endosialina, mediante la inhibición, por "silenciamiento génico postranscripcional", de la traducción del ARNm que codifica la proteína de transporte. Puede utilizarse el gen de la especie establecido como diana para la regulación a la baja, o un fragmento del mismo, para controlar la producción de la proteína codificada. Para ello pueden emplearse moléculas antisense, en la totalidad de su longitud (moléculas antisense "de longitud completa"). En otra opción, pueden utilizarse oligonucleótidos antisense que tengan como diana regiones concretas del ARNm que resultan cruciales para la traducción. Pueden obtenerse *in situ* moléculas antisense, de células transformadas con un constructo de ADN que, cuando es transcrito, produce las secuencias antisense de ARN. Pueden diseñarse tales constructos de manera tal que produzcan secuencias antisense de longitud completa o parcial. Este efecto de silenciamiento génico puede aumentarse sobreproduciendo, de manera transgénica, ARN tanto sense como antisense de la secuencia codificadora del gen, de modo que se produzca una cantidad alta de ARNs (véase, por ejemplo, Waterhouse *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:13959-64). En este aspecto, se ha observado que son particularmente eficaces los ARNs que contienen secuencias correspondientes a parte de al menos un intrón o correspondientes a la totalidad al menos un intrón. En una realización, parte o la totalidad de la cadena antisense de la secuencia codificadora es expresada por un transgén. En otra realización, se expresan transgénicamente las cadenas sense y antisense hibridadoras de parte o la totalidad de la secuencia codificadora de una endosialina.

Algunas de las células que se pueden establecer como diana o pueden de otro modo usarse en la invención son las células que expresan de manera natural la endosialina, o células transfectadas con un plásmido recombinante que expresa la endosialina. Las células primarias que expresan la endosialina, conforme a la invención, pueden aislarse de tejidos o comprarse a proveedores que venden células endoteliales como, entre otras posibles, células HUVEC o HMVEC, así como fibroblastos primarios y cultivados. Las células transfectadas de la invención comprenden

5 cualquier línea celular de expresión de insecto conocida, como, por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda*. Las líneas celulares de expresión pueden también ser líneas celulares de levaduras, como, por ejemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de expresión pueden ser también células de mamífero, como, por ejemplo, células ováricas de hámster chino, células de riñón de hámster bebé, línea de células embrionarias de riñón humano 293, líneas de células normales de riñón de perro, líneas de células normales de riñón de gato, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano, células COS, así como mioblastos no tumorigénicos murinos G8, líneas celulares de fibroblastos, líneas celulares de mieloma, células NIH/3T3 de ratón, células LMTK, células de Sertoli de ratón, células de carcinoma cervical humano, células de hígado de rata Buffalo, células de pulmón humano, células de hígado humano, células de tumor mamario de ratón, células TRI, células MRC-5, y células FS4.

10 La inhibición de la expresión de la endosialina inhibe la interacción de la endosialina con cualquier ligando de la endosialina. Los ligandos de la endosialina comprenden proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina y el colágeno.

15 En la presente invención se describen también métodos para inhibir la interacción entre la endosialina expresada por una célula que expresa la endosialina y un ligando de la endosialina, y dichos métodos comprenden bloquear u obstruir la expresión de endosialina por parte de la célula. Así, por ejemplo, una barrera física sirve para inhibir, impedir o, de otro modo, dificultar la interacción entre la endosialina expresada y un ligando de la endosialina. Cualquier compuesto químico o biomolécula puede servir para obstruir dicha interacción. En estos métodos se pueden usar, por ejemplo, moléculas pequeñas, polipéptidos, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que se unan de manera específica a la endosialina o, como alternativa, que se unan de manera específica a un ligando de la endosialina.

20 En algunas realizaciones preferidas, la inhibición de la interacción de una célula que expresa la endosialina con un ligando de la endosialina comprende inhibir la unión del ligando de la endosialina a la endosialina expresada. Por ejemplo, la interacción entre la endosialina y su ligando se dificulta, bloquea, impide u obstruye mediante una barrera molecular. De ese modo, queda dificultado, inhibido, bloqueado, impedido, obstruido o evitado el acceso del ligando a la célula. La obstrucción de la endosialina puede producirse mediante cualquier medio adecuado de este campo del conocimiento, tales como un compuesto químico o una biomolécula.

25 Por ejemplo, son compuestos químicos adecuados, entre otros posibles, las estructuras de aminoácidos, los esteroides, las ciclinas, los antracenos, los metales pesados, la quinolona, los terpenos, los compuestos fenólicos, los glucósidos, los alquiloideos, los lípidos, etc., o mezclas de lo anterior, que puedan ejercer un efecto biológico sobre las células que expresan la endosialina. Pueden generarse compuestos químicos mediante síntesis química u obtenerse mediante biocatálisis o de líquidos biológicos. Pueden obtenerse/derivarse compuestos químicos de las siguientes fuentes: seres humanos, mamíferos no humanos, plantas, levaduras, hongos y/o procariotas.

30 Los inhibidores competitivos inhiben la interacción de la endosialina o de una célula que expresa la endosialina con un ligando de la endosialina. Un "inhibidor competitivo" compite con el ligando por el lugar de unión a la endosialina. Los inhibidores competitivos son ligandos de la endosialina; por ejemplo, el colágeno (por ejemplo, colágeno I o colágeno IV) o la fibronectina, o fragmentos de dichas moléculas que se unen a ("fijan") la endosialina. Son inhibidores competitivos, asimismo, el fragmento N-terminal de 70 kDa de la fibronectina, el fragmento de 45 kDa de la fibronectina que se une a la gelatina, y el fragmento de 30 kDa de la fibronectina que se une a la heparina.

35 En realizaciones muy preferidas, se usan los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención para obstruir la interacción entre la endosialina expresada y los ligandos de la endosialina.

40 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser específicos de un epítipo situado en la endosialina, o pueden ser específicos de un epítipo situado en un ligando de la endosialina. Los más preferidos son los anticuerpos, o fragmentos (de anticuerpos) de unión al antígeno, específicos de la endosialina. Están disponibles comercialmente anticuerpos contra ligandos tales como la fibronectina, el colágeno y similares.

45 Los anticuerpos adecuados pueden ser policlonales o monoclonales, o pueden ser derivados o fragmentos de anticuerpos, que retengan la especificidad por la endosialina o por un ligando de la endosialina. Los anticuerpos pueden ser de cualquiera de las cinco clases de anticuerpos; es decir, de los isotipos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Los anticuerpos adecuados pueden ser también del isotipo IgY, que se encuentra generalmente en el suero de gallina o de pavo o en la yema de huevo de gallina o de pavo.

50 Los derivados de los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno son adecuados para su uso en la invención, y dichos derivados comprenden porciones de anticuerpos intactos que retienen la especificidad fijadora de antígeno de la molécula de anticuerpo progenitora. Por ejemplo, los derivados pueden comprender al menos una región variable (una región variable de una cadena pesada o de una cadena ligera). Son ejemplos de derivados y fragmentos de anticuerpos adecuados, entre otros posibles, los siguientes: anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, moléculas de una sola cadena (cadena única), así como moléculas Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fabc y Fv, anticuerpos de cadena única (Sc), cadenas ligeras individuales de anticuerpos, cadenas pesadas individuales de anticuerpos, fusiones químicas entre cadenas de anticuerpos y

otras moléculas, monómeros o dímeros de cadenas pesadas, monómeros o dímeros de cadenas ligeras, dímeros formados por una cadena pesada y una cadena ligera, y similares. Se pueden usar todos los isotipos de anticuerpo a fin de producir derivados y fragmentos de anticuerpos. Los derivados y fragmentos de anticuerpos se pueden producir recombinantemente.

5 Los anticuerpos adecuados para uso en la invención pueden derivarse de cualquier especie. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, de cabra, equinos, porcinos, bovinos, de gallina, de conejo, de burro, humanos y similares. Para uso en métodos de tratamiento, o para administración a seres humanos, se pueden alterar estructuralmente anticuerpos derivados de especies no humanas para que sean menos antigénicas cuando se administran a un paciente humano.

10 Por eso, en algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos que se usan son anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para producirlos son bien conocidos y están asentados en este campo del conocimiento. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender un dominio murino de unión a antígeno y un Fc humano o cualquier otro dominio estructural de esas características.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados pueden ser 15 inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos fijadoras de antígenos) que contengan una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de 20 complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor son reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de andamiaje (FWR o FR, por sus siglas en inglés) del dominio variable Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en las secuencias de andamiaje importadas. Estas modificaciones 25 se realizan para refinar y optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y generalmente dos, dominio o dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FWR son las de la secuencia de una inmunoglobulina humana. En el caso óptimo, el anticuerpo humanizado comprenderá también al menos una porción de una región 30 constante (Fc) de una inmunoglobulina; en general, la de una inmunoglobulina humana. Para información detallada adicional, véase Jones *et al.* (1986) *Nature*, 321:522-5; Reichmann *et al.* (1988) *Nature*, 332:323-9; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-6.

En aspectos preferidos de la invención, los anticuerpos son plenamente humanos. Eso significa que el anticuerpo es 35 exclusivamente de origen humano, o consta de otro modo de una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la forma humana del anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención se pueden marcar o de otro modo conjugar con diversas fracciones compuesto/sustancia químico/a o biomolécula; por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas o diagnósticas. Las 40 fracciones pueden ser citotóxicas; por ejemplo, pueden ser toxinas bacterianas, toxinas víricas, radioisótopos, y similares. Las fracciones pueden ser marcadores detectables; por ejemplo, pueden ser marcadores fluorescentes, radiomarcadores (marcadores radiactivos), biotina y similares. Las fracciones adicionales pueden comprender también, entre otras posibilidades, glicosilación, acetilación, "pegilación" (conjugación con polietilenglicol [PEG]), fosforilación, amidación. Los anticuerpos útiles en la invención pueden tener derivados que se obtienen mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otras proteínas, y similares.

45 Los expertos en la materia sabrán que la especificidad de los anticuerpos está determinada principalmente por las seis regiones CDR; en especial, por la CDR3 de la cadena pesada (cadena H) (Kala *et al.* (2002) *J. Biochem.*, 132:535-41; Morea *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.*, 275:269-94; y Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901- 17). No obstante, las regiones de andamiaje de los anticuerpos pueden desempeñar un papel en las interacciones antígeno-anticuerpo (Panka *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:3080-4), en particular en lo referente a su papel en la 50 conformación de los bucles CDR (Foote *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.*, 224:487-99). Por ello, los anticuerpos adecuados para uso en los métodos de la invención pueden comprender cualquier combinación de regiones CDR o FWR de cadena H (pesada) o de cadena L (ligera) que confiera especificidad por la endosialina o por los ligandos de la endosialina.

Las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se pueden usar conforme a la invención se 55 han puesto a la disposición de la Colección estadounidense de cultivos celulares (Amer. Type Cult. Coll., 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos) el 11 de marzo de 2008, y se les ha asignado el N.º de acceso: PTA-9017.

Se debe entender que, a causa de la variación natural de las secuencias que es probable que exista en las cadenas pesadas y ligeras y en los genes que las codifican, los expertos en la materia esperarían encontrar algún grado de

variación en las secuencias de aminoácidos o en los genes que las codifican, aunque siempre manteniendo las propiedades de fijación únicas (especificidad, afinidad) de los anticuerpos de la presente invención. Tal expectativa se debe en parte a que se sabe que se produce degeneración, de manera natural, en el código genético, así como al conocido éxito evolutivo de las variaciones conservadoras en las secuencias de aminoácidos, que no alteran de manera apreciable la naturaleza de la proteína codificada. Por lo tanto, dichas variantes y dichos homólogos se consideran sustancialmente iguales entre sí, y se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

Se contempla el uso, en la invención, de variantes que tengan sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazos de uno o más aminoácidos, y que retengan las propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad de unión o actividad efectora inmune) de los anticuerpos aquí descritos. Los expertos en la materia pueden producir variantes que tengan sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazos de uno o más aminoácidos. Dichas variantes puede comprender, por ejemplo: (a) variantes en las que uno o más residuos aminoácido sean sustituidos con aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añadan uno o más aminoácidos al polipéptido o eliminados ("deleciones") del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyan un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que el polipéptido se fusione con otro péptido o polipéptido tal como un socio de fusión, un marcador de una proteína, u otra fracción química, que pueda conferir propiedades útiles al polipéptido, como, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo, una secuencia polihistidina, una fracción biotina y similares. Los anticuerpos de la invención pueden comprender variantes en las que residuos aminoácido de una especie sean sustituidos con el residuo correspondiente en otra especie, en posiciones conservadas o no conservadas. En otras realizaciones, los residuos aminoácido situados en posiciones no conservadas son sustituidos con residuos conservadores o no conservadores. Las técnicas de obtención de dichas variantes, incluidas las técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas, son conocidas por los expertos en la materia.

La presente invención contempla anticuerpos, o fragmentos de ellos de unión al antígeno, que tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales a las secuencias de aminoácidos anteriormente descritas. Los anticuerpos M4 (que es producido por las células que tienen el N.º de acceso ATCC: PTA-9017 de la invención) y M4.1 son anticuerpos humanizados anti-endosialina humana. Si bien los anticuerpos M4 y M4.1 comparten la secuencia de la cadena ligera, difieren en su cadena pesada en una sola secuencia de aminoácidos que se observa, por ejemplo, en la diferencia entre el residuo 429 de la SEC N.º ID: 20 y el residuo 429 de la SEC N.º ID: 24. La invención contempla también anticuerpos, o fragmentos de ellos de unión al antígeno, que compiten por la unión a la endosialina con el anticuerpo M4 o M4.1. La invención contempla también anticuerpos, o fragmentos de ellos de unión al antígeno, que pueden unirse al mismo epítipo de la endosialina al que se unen el anticuerpo M4 o M4.1.

Los anticuerpos adecuados para uso en la invención pueden tener afinidades de unión por el antígeno diana, tal como la endosialina o un ligando de la endosialina, que comprendan una constante de disociación ( $K_D$ ) inferior a  $1 \times 10^{-2}$  M. En algunas realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-3}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-4}$  M. En algunas realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-5}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-6}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-7}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-8}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-9}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-10}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-11}$  M. En algunas realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-12}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-13}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-14}$  M. En otras realizaciones, la  $K_D$  es inferior a  $1 \times 10^{-15}$  M.

La especificidad y/o la afinidad de los anticuerpos que se unen a la endosialina pueden, opcionalmente, optimizarse mediante evolución dirigida de las células que producen el anticuerpo, usando un alelo negativo dominante de un gen de reparación de discordancias tal como PMS1, PMS2, PMS2-134, PMSR2, PMSR3, MLH1, MLH2, MLH3, MLH4, MLH5, MLH6, PMSL9, MSH1 y MSH2, introducido en las células productoras del anticuerpo. Las células que contengan el mutante negativo dominante se volverán hipermutables y acumularán mutaciones a una velocidad mayor que las células de control no transfectadas. Puede analizarse un grupo de células mutantes para identificar y seleccionar clones que produzcan anticuerpos o proteínas de unión de mayor afinidad/especificidad, o que produzcan concentraciones más altas de anticuerpos o de proteínas de unión, o que simplemente crezcan más deprisa o mejor en ciertas condiciones. La técnica para la generación de células hipermutables usando alelos negativos dominantes de genes de reparación de discordancias se describe en la patente estadounidense N.º 6146894. Otra opción es que la reparación de discordancias sea inhibida usando los inhibidores químicos de la reparación de discordancias que se describen en WO 02/054856. La técnica de mejora de los anticuerpos usando alelos negativos dominantes de genes de reparación de discordancias o inhibidores químicos de la reparación de discordancias puede aplicarse a células de expresión que sean de mamíferos, de levaduras, de plantas o procarióticas y que expresen también genes clonados de inmunoglobulina o de proteína. Las células que expresan los alelos negativos dominantes o una molécula pequeña pueden "curarse", en el sentido de que se puede "desactivar" el alelo negativo dominante, si es inducible, o de que puede eliminarse de la célula dicho alelo negativo dominante, mientras que, en el caso del compuesto químico pequeño, puede ser retirado del cultivo de crecimiento, con lo que se obtienen células que son de nuevo genéticamente estables y que dejan de acumular mutaciones a una velocidad anormalmente alta.

La inhibición de la expresión de la endosialina inhibe la interacción de la endosialina con cualquier ligando de la endosialina. Los ligandos de la endosialina comprenden proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina y el colágeno. Cualquier subtipo de colágeno puede servir de ligando de la endosialina. No obstante, se prefieren el

colágeno I y el colágeno IV.

La inhibición de la interacción de la endosialina con los ligandos de la endosialina inhibe rutas y cascadas que son reguladas al alza o activadas a causa de dicha interacción. Por ejemplo, la interacción de la endosialina con los ligandos de la endosialina puede promover la expresión y/o la activación de moléculas de adhesión tales como las integrinas, que median la unión de la célula a la matriz extracelular o a otras células, y que median las rutas de señalización celular, entre otras cosas.

Las integrinas suelen existir como heterodímeros que contienen dos cadenas diferentes: una subunidad  $\alpha$  (alfa) y una subunidad  $\beta$  (beta). Se han caracterizado aproximadamente 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ . Además, hay diversas combinaciones de la integrina que existen como variantes obtenidas mediante splicing diferencial. Las diversas combinaciones de subunidades alfa y beta de la integrina dan pie a más de 24 complejos activos de integrina únicos (Hynes (2002) *Cell*, 110:673). Las subunidades de la integrina penetran en la membrana plasmática; en general, contienen además dominios citoplásmicos cortos de unos 40-70 aminoácidos. Fuera de la membrana plasmática celular, las cadenas alfa y beta residen muy cerca la una de la otra, a lo largo de una longitud de unos 23 nm. Los extremos aminoterminales de cada cadena de la integrina están yuxtapuestos a una distancia de 5 nm (o menos) entre sí, formando una región de unión a ligandos para la interacción con las EMP. Las integrinas se clasifican conforme a varios criterios. Las cadenas alfa se clasifican como alfa porque un subconjunto de las cadenas  $\alpha$  tienen elementos estructurales insertados cerca del extremo aminoterminale, denominado dominio alfa-A porque tiene un motivo estructural similar al de los dominios A comprendidos dentro del factor de von Willebrand. Las integrinas que portan dicho dominio pueden unirse a colágenos (complejos de integrina  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$ ) o actuar como moléculas de adhesión célula-célula con los complejos que contienen integrinas de la familia  $\beta 2$ . Las dos funciones principales de las integrinas son la unión de la célula a las proteínas de la matriz extracelular (EMP) y la transducción de señales a la célula, mediada por la unión EMP-integrina. Además, las integrinas participan en un amplio abanico de otras actividades biológicas, como la fijación de virus, tales como adenovirus, ecovirus, hantavirus y virus de la fiebre aftosa, como la unión a células que participan en el patrullaje inmunitario, y como el contacto célula-célula para la migración celular. Las integrinas acoplan las EMP (qué EMP depende del complejo de integrina del que se trate) al citoesqueleto del interior de la célula. Se han identificado varios ligandos de las integrinas. Los ligandos más frecuentes son la fibronectina, la vitronectina, el colágeno y la laminina. Las interacciones entre la integrina, una EMP y los microfilamentos del interior de la célula están vinculadas por proteínas de andamiaje, entre las que están la talina, la paxilina y la alfa-actinina. Esas interacciones conducen a la regulación de quinasas como la FAK (quinasa de adhesión focal) y como los miembros de la familia de las Src quinasas, en cuanto a su fosforilación de sustratos como p130CAS, con lo que se reclutan adaptadores de la señalización tales como Crk para mediar respuestas celulares como la activación de rutas, la proliferación celular y/o la supervivencia celular. Cualquiera de estas funciones asociadas a las integrinas puede ensamblarse en forma de prueba de selección con la que monitorizar la actividad de las integrinas como función de la actividad de la endosialina, para ensayos en los que se busca identificar sustancias farmacológicas, o moléculas dirigidas eficazmente contra la endosialina como diana. Además, dirigirse contra las integrinas mediante sustancias farmacológicas que tengan como diana a la endosialina en células que expresan la endosialina ofrece amplias oportunidades de supresión de las infecciones víricas mediadas por las integrinas, así como de otras patologías.

Así, inhibir la interacción de la endosialina con un ligando de la endosialina inhibe la expresión y/o la activación de las moléculas de integrina en la célula que expresa la endosialina. En algunas realizaciones preferidas, la expresión o la activación de la integrina  $\beta 2$ ,  $\beta 2$  o  $\beta 3$  es suprimida por dicha inhibición.

Otras moléculas y rutas cuya expresión y/o activación es o son afectadas por la inhibición de la interacción de la endosialina con los ligandos de la endosialina son las metaloproteinasas de la matriz (MMPs, por sus siglas en inglés). Las MMPs son proteasas dependientes de zinc que desempeñan una función, entre otras cosas, en la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, en los receptores de la superficie celular, y similares. Las MMPs desempeñan una función en la migración celular, la proliferación celular, y la angiogénesis, entre otras cosas. La familia de enzimas MMPs tienen un motivo común de fijación de zinc (HExxHxxGxxH) dentro de su sitio activo, así como una metionina conservada, después de dicho sitio activo. Las MMPs se clasifican con arreglo a la homología que muestran entre sí, su especificidad por su sustrato y, en parte, su localización celular (lugar en la célula). Se agrupan de manera general en 4 clases: colagenasa, estromelisinasa, gelatinasa, y las MMPs tipo membrana (MT-MMPs, por sus siglas en inglés). Las MMPs tipo colagenasa son capaces de degradar los colágenos fibrilares de triple hélice, produciendo fragmentos bien diferenciados. Dichos colágenos son los componentes principales del hueso y del cartilago, y esta clase de MMPs son las únicas enzimas de mamíferos, que se sepa, capaces de degradarlos. Comprenden la MMP-1 (colagenasa intersticial), la MMP-8 (colagenasa de los neutrófilos), la MMP-13 (colagenasa 3), y la MMP-18. Las enzimas MMPs tipo estromelisinasa muestran una amplia capacidad para escindir las EMP, pero son incapaces de escindir los colágenos fibrilares de triple hélice. Esta clase comprende: MMP-3 (estromelisinasa 1), MMP-10 (estromelisinasa 2), MMP-11 (estromelisinasa 3), MMP-12 (metaloelastasa de los macrófagos), MMP-19 (RASI-1, también denominada estromelisinasa 4), MMP-20 (enamelinasa), MMP-22 (C-MMP), MMP-27. Las MMPs tipo gelatinasa degradan principalmente el colágeno de tipo IV y la gelatina, y se distinguen por la presencia de un dominio adicional insertado en el dominio catalítico. La región de unión a la gelatina está situada justo antes del motivo de fijación de zinc, y conforma una unidad de plegado separada que no altera la estructura del dominio catalítico. Esta clase comprende: MMP-2 (gelatinasa de 72 kDa, gelatinasa-A), MMP-9 (gelatinasa de 92 kDa, gelatinasa-B). Por último, las MMPs unidas a membrana ("MMPs tipo

membrana”) son las que se unen a la membrana celular externa. Comprenden: la MMP-23 con ordenamiento (“array”) cisteína transmembrana de tipo-II; las MMPs 17 y 25 (MT4-MMP y MT6-MMP, respectivamente) unidas a glicosilfosfatidilinositol; y las MMPs transmembranales de tipo-I 14, 15, 16, 24 (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP y MT5-MMP, respectivamente). Todas estas MMPs tienen un sitio de escisión por furina en el propéptido, que es una característica que comparten con la MMP-11.

Inhibir la interacción de la endosialina con un ligando de la endosialina inhibe la expresión y/o la activación de las MMPs en la célula que expresa la endosialina; la expresión o la activación de MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13 o MMP-18 puede ser suprimida por dicha inhibición.

Sin ánimo de limitación a una teoría o un mecanismo de funcionamiento concretos, se cree que la endosialina funciona directa o indirectamente en la angiogénesis; en particular, con respecto a la neovascularización y a enfermedades tales como el cáncer. Por lo tanto, se cree que el desbaratamiento de la unión de la endosialina o de las células que expresan la endosialina a los ligandos de la endosialina, o el desbaratamiento de la activación mediada por endosialina de las integrinas, de la expresión de las MMPs y/o de la proliferación/supervivencia celular, puede suprimir la vascularización asociada a las enfermedades neovasculares.

Por eso, la presente invención describe métodos para inhibir la angiogénesis. Dichos métodos pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. Los métodos para inhibir la angiogénesis pueden comprender administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que obstruye la endosialina expresada en la superficie de una célula, y dicha obstrucción inhibe la interacción de dicha célula con un ligando de la endosialina, y la inhibición de dicha interacción de dicha célula con dicho ligando inhibe la angiogénesis de un tejido, un órgano o un neoplasma en dicho sujeto.

Los métodos para inhibir la angiogénesis pueden también comprender poner en contacto una célula, un cultivo celular, un tejido o un órgano con una composición que obstruye la endosialina expresada en la superficie de una célula, y dicha obstrucción inhibe la interacción de dicha célula con un ligando de la endosialina, y la inhibición de dicha interacción de dicha célula con dicho ligando inhibe la angiogénesis por dicha célula, dicho cultivo celular, dicho tejido o dicho órgano.

La composición puede comprender al menos uno de los inhibidores competitivos aquí descritos. En algunas realizaciones, los inhibidores competitivos son ligandos de la endosialina; por ejemplo, colágeno, fibronectina, o fragmentos de dichas moléculas que se unen a la endosialina. Son inhibidores competitivos preferidos: fragmentos de colágeno I, fragmentos de colágeno IV o fragmentos de fibronectina. Los inhibidores competitivos más preferidos son: el fragmento N-terminal de 70 kDa de la fibronectina, el fragmento de 45 kDa de la fibronectina que se une a la gelatina y el fragmento de 30 kDa de la fibronectina que se une a la heparina.

La composición comprende al menos un anticuerpo que se une de manera específica a la endosialina. Los anticuerpos con esa característica tienen preferiblemente una afinidad por la endosialina inferior a  $1 \times 10^{-7}$  M aproximadamente, más preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-8}$  M aproximadamente, más preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-9}$  M aproximadamente, y más preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-10}$  M aproximadamente. Los anticuerpos que se unen de manera específica a la endosialina pueden comprender los anticuerpos cuyas características se describen y ejemplifican en la presente invención. Las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se pueden usar conforme a la invención se han puesto a la disposición de la Colección estadounidense de cultivos celulares (Amer. Type Cult. Coll., 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos) el 11 de marzo de 2008, y se les ha asignado el N.º de acceso: PTA-9017. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos de unión al antígeno, quiméricos, humanizados, totalmente humanos y similares, conforme a los que aquí se describen.

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

La invención describe también métodos para inhibir la neovascularización. Dichos métodos pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. Los métodos para inhibir la neovascularización pueden comprender administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que obstruye la endosialina expresada en la superficie de una célula, y dicha obstrucción inhibe la interacción de dicha célula con un ligando de la endosialina, y la inhibición de dicha interacción de dicha célula con dicho ligando inhibe la neovascularización de un tejido, un órgano o un neoplasma en dicho sujeto.

Los métodos para inhibir la neovascularización pueden comprender poner en contacto una célula, un cultivo celular, un tejido o un órgano con una composición que obstruye la endosialina expresada en la superficie de una célula, y dicha obstrucción inhibe la interacción de dicha célula con un ligando de la endosialina, y la inhibición de dicha interacción de dicha célula con dicho ligando inhibe la neovascularización de dicha célula, dicho cultivo celular, dicho tejido o dicho órgano.

La composición comprende al menos uno de los inhibidores competitivos que aquí se describen. Los inhibidores competitivos pueden ser ligandos de la endosialina; por ejemplo, colágeno, fibronectina, o fragmentos de dichas

moléculas que se unen a la endosialina. Son inhibidores competitivos preferidos: fragmentos de colágeno I, fragmentos de colágeno IV, o fragmentos de fibronectina. Los inhibidores competitivos más preferidos son: el fragmento N-terminal de 70 kDa de la fibronectina, el fragmento de 45 kDa de la fibronectina que se une a la gelatina y el fragmento de 30 kDa de la fibronectina que se une a la heparina.

- 5 En realizaciones preferidas, la composición comprende al menos un anticuerpo que se une de manera específica a la endosialina. Los anticuerpos con esa característica tienen preferiblemente una afinidad por la endosialina inferior a  $1 \times 10^{-7}$  M aproximadamente, más preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-8}$  M aproximadamente, más preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-9}$  M aproximadamente, y más preferiblemente inferior a  $1 \times 10^{-10}$  M aproximadamente. Los anticuerpos que se unen de manera específica a la endosialina pueden comprender los anticuerpos cuyas características se describen y ejemplifican en la presente invención. Las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se pueden usar conforme a la invención se han puesto a la disposición de la Colección estadounidense de cultivos celulares (Amer. Type Cult. Coll., 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos) el 11 de marzo de 2008, y se les ha asignado el N.º de acceso: PTA-9017. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos de unión al antígeno, quiméricos, humanizados, totalmente humanos y similares, conforme a los que aquí se describen.

La inhibición de la expresión de la endosialina inhibe la interacción de la endosialina con cualquier ligando de la endosialina. Los ligandos de la endosialina comprenden proteínas de la matriz extracelular tales como la fibronectina; por ejemplo, fibronectina humana (SEC N.º ID: 35) y colágeno humano.

- 20 Para que esta invención puede ser entendida y puesta en práctica con mayor facilidad, a continuación se hará referencia a uno o más ejemplos; en dicho o dichos ejemplos, al menos parte de la presente invención se describe a partir del trabajo experimental llevado a cabo durante el desarrollo de la misma.

Cualesquiera ejemplos que no estén incluidos dentro del ámbito de las reivindicaciones se proporcionan únicamente como información complementaria.

#### Ejemplo 1

- 25 Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la endosialina en tejido maligno

Mediante inmunohistoquímica de tejidos malignos, se mostró el uso de anticuerpos para la detección de células que expresan la endosialina. Se aplicó anticuerpo anti-endosialina o anticuerpo IgG normal a tejidos de cáncer colorrectal humano recién congelado, a dos concentraciones (0,5 µg/ml y 2,5 µg/ml). Una solución salina tamponada con fosfato [PBS, por sus siglas en inglés (NaCl 0,15M, pH 7,2)] + 1% seroalbúmina bovina sirvió de diluyente de los anticuerpos primarios. Los tejidos se incluyeron en medio Tissue-Tek® O.C.T., se congelaron sobre hielo seco, y se almacenaron en bolsas de plástico selladas a una temperatura inferior a -70 °C. Se realizaron cortes de dichos tejidos a intervalos de aproximadamente 5 µm, y se fijaron durante 10 minutos en acetona a temperatura ambiente. Los cortes se almacenaron a una temperatura inferior a -70 °C hasta su tinción. Justo antes de la tinción, los cortes se fijaron durante 10 segundos en formol al 10% tamponado neutro.

- 35 Los criocortes se enjuagaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS [NaCl 0,15M, pH 7,2]). Se bloqueó la peroxidasa endógena mediante incubación de los cortes con la solución de peroxidasa presente en el kit Dako EnVision™ Kit, durante 5 minutos y enjuagando dos veces en PBS (NaCl 0,15M, pH 7,2). Después, los cortes se trataron durante 20 minutos con un bloqueo proteico diseñado para reducir la unión no específica. El bloqueo proteico se preparó de la siguiente manera: PBS (NaCl 0,15M, pH 7,2); caseína al 0,5%; seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) al 1%; y suero normal de cabra al 1,5%. Después del bloqueo proteico, se aplicó el anticuerpo primario (elemento de ensayo M4, anticuerpo de control negativo, o ninguno [solo el tampón, como control del ensayo]) a temperatura ambiente durante una hora. Después, los cortes se enjuagaron dos veces con PBS (NaCl 0,15M, pH 7,2), se trataron con el polímero de anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa, presente en el kit Dako EnVision™ Kit, durante 30 minutos (polímero EnVision™ usado a la concentración proporcionada por el fabricante), se enjuagaron dos veces con PBS (NaCl 0,15M, pH 7,2), y se trataron con la solución de sustrato-cromógeno (DAB), presente en el kit Dako EnVision™ Kit, durante 8 minutos. Todos los cortes se enjuagaron en agua, se sometieron a contratinción con hematoxilina, se deshidrataron y se cubrieron con cubreobjetos, para su interpretación. Como se puede observar, los vasos sanguíneos del tumor (Figura 1A) dieron positivo a endosialina, mientras que los cortes en serie teñidos con anticuerpo isotipo de control dieron negativo (Figura 1B).

- 50 Ejemplo 2

Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la endosialina en tejido sano

Mediante inmunohistoquímica de tejidos normales, se mostró el uso de anticuerpos para la detección de células que expresan la endosialina. Descrito brevemente, se realizaron cortes de especímenes de tejidos normales, mediante criostato, y se analizó su expresión de la endosialina, de la manera descrita en el Ejemplo 1. Los tejidos normales contenían muy pocos fibroblastos y células tipo célula dendrítica que expresasen la endosialina, y no tan intensa ni homogéneamente como lo observado en los vasos sanguíneos de los tumores (Figuras 2A y B). Estas células resultan útiles para estudiar los efectos de la neovascularización y pueden aislarse para ver su expresión génica, a

- 55

fin de estudiar los perfiles de crecimiento, diferenciación y migración celulares o de identificación de las “firmas” características. Pueden estudiarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* usando métodos conocidos por los expertos en la materia, así como usando los que se indican en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 3

##### 5 Aislamiento y enriquecimiento de células que expresan la endosialina

A fin de demostrar que las proteínas que se pueden unir a la endosialina sirven de método eficaz para enriquecer las células endoteliales o las células tipo fibroblasto que expresan la endosialina, se concentraron células endoteliales microvasculares humanas (HMVECs, por sus siglas en inglés) usando un anticuerpo que se puede unir a la endosialina, a fin de aislar una población enriquecida de células que expresan la endosialina a partir de un grupo de células inicial que contenía un 5-10% de células que expresaban la endosialina. Sin ánimo de limitación al método o a los reactivos concretos que se describen a continuación, este ejemplo ilustra el uso de anticuerpos anti-endosialina que pueden aislar células que expresan la endosialina.

Descrito brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con Fc $\gamma$  de cabra anti-IgG humana, en condiciones estériles. Después, se añadieron 20  $\mu$ g/ml de un anticuerpo M4 anti-endosialina humana a las placas, se usaron tres pocillos (A, B, C) como controles sin anticuerpo, y se incubaron las placas durante 1 hora a 4 °C. Se cosecharon HMVECs de cultivos en placas de Petri de 10 cm con DPBS/EDTA, en vez de con tripsina, a fin de evitar dañar las membranas celulares, dejando así intactas las proteínas endosialina de la superficie celular. Las células agrupadas se dispusieron en placas a dos concentraciones diferentes (100.000 células/pocillo o 50.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos, tras aspirar y eliminar mediante lavado el anticuerpo anti-endosialina no unido. Las células se incubaron en las placas durante una hora a 4 °C. Después, las placas se lavaron cuatro veces con DPBS/FBS (hasta que los pocillos de control A, B y C no mostraron célula alguna dentro de ellos). La placa con 50.000 células/pocillo mostró muy pocas células, mientras que los pocillos con 100.000 células/pocillo contenían una cantidad de células unida a la placa. Después, las células se incubaron durante tres días en medios de crecimiento adecuados. Se seleccionaron los pocillos de control B y C de las placas de 100.000 células/pocillo, para su inmunotinción. Se usó tinte calceína AM para tefir las células, a fin de visualizarlas usando un microscopio de fluorescencia Nikon® Eclipse TS100. Los cultivos concentrados positivos se ampliaron, para su crecimiento y el posterior análisis de la expresión homogénea de endosialina, como se describe a continuación.

A fin de determinar la capacidad para aislar células que expresan la endosialina, se prepararon para inmunotinción cultivos de células HMVEC concentrados con anticuerpo anti-endosialina y cultivos de células HMVEC no concentrados; para dicha inmunotinción se usó un anticuerpo fluorescente anti-endosialina o un anticuerpo fluorescente anti- $\alpha$ - $\beta$ 1-integrina como control. Como se esperaba, más del 90% de las células de los cultivos concentrados y de los cultivos no concentrados (no se muestran aquí) dieron positivo a la  $\alpha$ - $\beta$ 1-integrina, más del 90% de las células de los cultivos concentrados dieron positivo a la endosialina, y solo un 5-7% de las células dieron positivo a la endosialina en los cultivos de HMVEC no concentrados. Estos datos demuestran la capacidad para aislar y para enriquecer células que expresan la endosialina viables, usando proteínas que se unen a la endosialina, como, por ejemplo, anticuerpos.

Como se indica en la Figura 3, el cultivo concentrado tenía un número mucho mayor de células positivas a la endosialina que el cultivo parental no concentrado, conforme a lo determinado mediante inmunotinción con un anticuerpo anti-endosialina y, después, con un anticuerpo secundario fluorescente conjugado. La cantidad de células de cada campo se determinó mediante microscopía lumínica.

#### Ejemplo 4

##### Interacción de la endosialina con proteínas de la matriz extracelular

*Construcción de plásmidos de expresión de la TEM1 y de la Fc-TEM-1.* Se usó PCR para amplificar un fragmento de ADN que representa los aminoácidos 1-685 del marco de lectura abierto de la TEM1 (N.º GenBank: AF279142); dicho fragmento procede del ADN genómico de la línea celular LA1-5S. Los amplicones resultantes se digirieron con *EcoRI* y *XbaI* y se ligaron a pEF6-V5-HisA (Invitrogen). A fin de generar la Fc-TEM-1, se fusionó la región extracelular de la TEM1 con el dominio Fc $\gamma$  de una IgG2 $_b$  murina monomérica y se ligó al vector derivado pEF6-EK-Mm-IgG2b-Fc $\gamma$ -ND, que contiene una región de reconocimiento de la enteroquinasa (DDDD) seguida de un dominio Fc $\gamma$  (desde la región bisagra hasta el dominio CH3) de una IgG2 $_b$  murina modificada. A fin de prevenir la dimerización, se reemplazaron por serina los cuatro residuos cisteína responsables de la unión de las cadenas pesadas mediante puentes disulfuro. La proteína de fusión monomérica secretada resultante consta del dominio extracelular, de longitud completa, de la TEM1, y del Fc $\gamma$  de la IgG2 $_b$  murina. Se verificó la integridad de las secuencias de todos los plásmidos mediante secuenciación DTCS Beckman® (Beckman Coulter, Fullerton, California, Estados Unidos). Se adquirieron los datos sin procesar con un secuenciador de ADN CEQ 8000 y se analizaron dichos datos usando el software VectorNTI® (Invitrogen).

*Purificación de la Fc-TEM-1.* Se cultivaron células CHO-TEM1-Fc $\gamma$ , a una escala de 25 litros, en medio IS-CHO-CD (Irvine Scientific, Santa Ana, California, Estados Unidos) suplementado con L-glutamina 2 mM, 1X penicilina/estreptomina, 6 g/l de hidrolizado de soja y 2,2 g/l de bicarbonato sódico (Irvine Scientific), en una

plataforma Wave20/50EH dotada de un Cellbag50® (GE Healthcare, Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos), hasta que la viabilidad del cultivo alcanzó el 50-70%. Se clarificó el medio extracelular acondicionado usando un sistema de fibra hueca Flexstand® Benchtop Pilot Hollow Fiber System (GE Healthcare) dotado de un cartucho de fibra hueca de 0,2 µm (GE Healthcare), hasta que en el recipiente contenedor quedaron 0,5 l de cultivo. Entonces, la masa celular concentrada se lavó con 4 l de solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato potásico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2), a fin de recuperar el líquido extracelular restante. El lavado de 4 l se añadió a la materia prima clarificada. Después, el medio de cultivo clarificado se concentró x12 (de 29 l a 2,5 l), usando un conjunto de cartuchos de ultrafiltración enrollados en espiral Prep/Scale® de 2,5 pies<sup>2</sup> para 100.000 Da en un contenedor (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) impulsado por una bomba peristáltica con una presión de entrada de 20 PSI, y una velocidad de recirculación de aproximadamente 400 ml/min. La materia prima concentrada resultante se esterilizó por filtración a través de filtros de cuello de botella dotados de una membrana de 0,2 µm (Nalgene). Se capturó la TEM1-Fc<sub>γ</sub> mediante cromatografía de afinidad con proteína A, sobre una columna de ProSep-vA® (Millipore) de 10 x 100 mm, y se eluyó mediante adición de 5 volúmenes de columna de tampón de elución (citrato 100 mM/acetato 10 mM, pH 3,0). El material eluido se dializó frente a tampón QA (Tris-Cl 20 mM, pH 8,0), y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre una columna HiTrap® Q-FF (GE Healthcare) de 5 ml. Las proteínas unidas se lavaron con tampón QB al 15% (Tris-Cl 20 mM, NaCl 1M, pH 8,0), seguido de elución de la Fc-TEM-1 unida usando 35% tampón QB. Las proteínas eluidas se concentraron mediante ultrafiltración en un módulo de ultrafiltración con presión positiva Modelo 8400 (Millipore) dotado de una membrana con un MWCO (valor de corte del peso molecular nominal) de 100 kDa (Millipore), obteniéndose un volumen final de 5 ml, aproximadamente. La Fc-TEM-1 concentrada se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño preparativa sobre una columna de Sephacryl® S-300HR de 26 x 60 (GE Healthcare) equilibrada con PBS. Las fracciones que contenían Fc-TEM-1 purificada se agruparon, se concentraron hasta un intervalo nominal entre 0,1 mg/ml - 1 mg/ml mediante ultrafiltración usando una membrana con un MWCO de 100 kDa, y se almacenaron en forma de alícuotas de un solo uso a -80 °C.

La Fc-TEM-1 (2,9 µg) purificada se cargó en un gel de Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen, Inc.), y se sometió a electroforesis en tampón MOPS (ácido (3-(N-morfolino)propanosulfónico) para electroforesis (MOPS 50 mM, Tris 50 mM, SDS 3,5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,7) durante 40 minutos. Para la tinción, el gel se fijó durante 15 minutos en solución de fijación (metanol al 50%, ácido acético al 10%), se lavó dos veces durante 10 minutos en agua desionizada, y se tiñó durante al menos una hora con azul de Coomassie coloidal GelCode® (Pierce). El gel se destiñó mediante lavado repetido con agua desionizada.

Se usaron placas de 96 pocillos previamente revestidas de fibronectina (FN), colágeno I (Col I), colágeno IV (Col IV), laminina (LN) (BD Biosciences, San Diego, California, Estados Unidos), vitronectina (VN) o gelatina (Gel) (Chemicon Intl.) para evaluar la unión de la Fc-TEM-1. La unión de la TEM1 a Col I, Col IV y FN no se debió a la presencia de restos de contaminantes de plasma humano en la proteína purificada, puesto que no se detectó Col I ni Col IV en FN mediante ELISA con anticuerpos anti-Col, y tampoco se detectó FN en Col (no se muestran los datos). Todas las placas se bloquearon con tampón de ensayo (BSA al 0,5%, Tween-20 al 0,5% en PBS) durante 2 horas, antes de la adición de la proteína de fusión Fc-TEM-1, una endosialina soluble generada mediante la fusión de la secuencia líder aminoterminal y de la totalidad del dominio extracelular de la endosialina con una cadena pesada gamma murina. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se añadió durante 1 hora anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) humana conjugado con HRP (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pensilvania, Estados Unidos). El revelado del color se evaluó usando el sustrato para peroxidasa TMB (tetrametilbencidina) SureBlue™ (KPL, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos). Como controles negativos se usaron BSA y un anticuerpo isotipo de control humano. La Fc-TEM-1 no se unió a la BSA, y el isotipo humano no se unió a ninguna de las proteínas de la ECM (no se muestran los datos).

Como se ilustra en la Figura 4A, la Fc-TEM1 se unió a la fibronectina y al colágeno I y IV de manera dependiente de dosis; por contra, no se observó unión alguna, dentro de todo el intervalo de dosis, a la LN ni a la VN. Un hecho interesante es que si bien la Fc-TEM1 se unió al colágeno, no se observó unión, en grado detectable, a la gelatina (colágeno desnaturalizado térmicamente). Ninguno de cuatro anticuerpos IgG isotipo murinos que se probaron se unió a ninguna de las proteínas de la ECM, lo que descarta la posibilidad de que las interacciones estuviesen mediadas por el esqueleto de Fc murino de la proteína de fusión Fc-TEM1 (no se muestran los datos). Una proteína de fusión que contiene la cadena pesada gamma murina y únicamente el dominio lectina de la endosialina también se une a la FN (no se muestran los datos).

A fin de confirmar la selectividad de la interacción entre la Fc-TEM1 y la proteína de la ECM, se aplicó Fc-TEM1 a placas de ELISA revestidas de diferentes proteínas purificadas. Se llevaron a cabo pruebas ELISA específicas de antígeno recubriendo placas de ELISA TP ImmunoMini con 1 µg/ml de STEB (vacuna contra la enterotoxina B de *Staphylococcus*), 2 µg/ml de gammaglobulina bovina, 2 µg/ml del antígeno glicoproteína de 90 kD asociada a tumores que se expresa en la mayoría de las células de melanoma (TA90), 2 µg/ml de lisozima de huevo de gallina, una dilución 1:500 de toxoide tetánico, BSA al 1%, 0,2 µg/ml de mesotelina humana, 2 µg/ml de ovalbúmina (OVA), 1 µg/ml de GM-CSF humano, 2 µg/ml de IgG de cabra, 2 µg/ml de IgG murina (disolución en tampón bicarbonato de recubrimiento [pH 9,6, Sigma]) durante toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (que contenía TWEEN-20 al 0,5%), se bloquearon con tampón de ensayo 1x durante 2 horas a temperatura ambiente, y se llevó a cabo ELISA como se ha descrito arriba. Como se ilustra en la Figura 4B, la Fc-TEM1 no se unió a ninguna de las proteínas probadas, salvo en el caso del anti-Fc murino usado como control positivo.

## Ejemplo 5

## Inhibición de la unión de TEM1 a fibronectina de plasma humano

Se pre-recubrieron placas de 96 pocillos con fibronectina (FN), y se evaluó, mediante ELISA, la capacidad de los anticuerpos anti-TEM-1 para bloquear la adhesión mediada por Fc-TEM-1. Descrito brevemente, la placa recubierta de FN se bloqueó con tampón de ensayo (BSA al 0,5%, Tween-20 al 0,5% en PBS) durante 2 horas, antes de la adición de proteínas de fusión. Se pre-incubó la Fc-TEM-1 durante 1 hora a 4 °C con el anticuerpo M4 (un anticuerpo humanizado anti-endosialina que se describe como ES1 en la patente estadounidense N.º 20060239911), con anticuerpo isotipo humano (HulgG), o con anticuerpo anti-TEM-1 generado en conejos (RbtTEM1). M4 no se une a homólogos de la endosialina de otras especies, salvo a los de los primates no humanos. El epítipo de unión del M4 se ha asignado al dominio lectina extracelular de la endosialina. Se añadió el complejo proteína/anticuerpo a la placa recubierta de FN, y se dejó que se adhiriese durante 1 hora a temperatura ambiente; después, se lavaron las placas y se añadió durante 1 hora el anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) humana conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, Estados Unidos). El revelado del color se evaluó usando el sustrato para peroxidasa TMB (tetrametilbencidina) SureBlue™ (KPL, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos). Como se ilustra en la Figura 6, el anticuerpo M4 suprimió la unión de la Fc-TEM1 a la fibronectina, mientras que un anticuerpo inespecífico de control (HulgG) no suprimió la unión. El anticuerpo RbtTEM1 también suprimió la unión de Fc-TEM1 a la fibronectina (no se muestran los datos).

## Ejemplo 6

## La endosialina media la adhesión a la fibronectina

Se generaron células CHO-TEM1 que expresan de manera estable la endosialina (hecho verificado mediante FACS con el anticuerpo M4; no se muestran los datos). Las células CHO-K1 se mantuvieron en RPMI suplementado con L-glutamina, un mínimo del 1% de aminoácidos esenciales, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, y FBS al 10% inactivado térmicamente (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Se electroporaron células CHO-K1 ( $3 \times 10^6$ ) (ATCC, Manassas, Virginia, Estados Unidos) con 10 µg de ADN de plásmido linearizado en una cubeta de electroporación de 0,4 mm. Se administró un impulso de 170 V/1000 µF usando un dispositivo GENE PULSER (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos). Se dejó que las células electroporadas se recuperasen durante 24 horas; después, se seleccionaron los clones resistentes a la blasticidina (5 µg/ml). Se verificó la expresión de la endosialina mediante FACS y se seleccionaron las células que mostraban una expresión alta de la endosialina.

Las células ( $1,5 \times 10^5$  células/pocillo) se lavaron y se suspendieron en PBS que contenía  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ; después, se añadieron por cuadruplicado a una placa de 96 pocillos revestida de fibronectina, y se dejó que se adhiriesen durante 1 hora. En caso oportuno, las células se pre-incubaron con anticuerpo (100 µg/ml) M4 o isotipo humano (IgG) durante 1 hora, antes del inicio de los ensayos. Tras dejar que las células se adhiriesen, se lavó la placa 5 veces con PBS, y se midió la viabilidad usando CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). La Figura 9B muestra que la sobreexpresión de la endosialina ocasiona una mayor unión celular a la fibronectina, que puede ser bloqueada por inhibidores de la endosialina tales como el anticuerpo M4, a diferencia de los controles tales como la IgG inespecífica, que no pueden.

## Ejemplo 7

## Unión de la endosialina a la fibronectina y a fragmentos de fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína compleja de gran tamaño que existe como dímero enlazado de manera covalente por un puente disulfuro a nivel del extremo carboxiterminal de la proteína (Ruoslahti *et al.* (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:7277-7281; Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer (2003) *J. Cell Sci.*, 116:3269-3276; Magnusson & Mosher (1998) *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.*, 18:1363-1370). Se ha descrito que los fragmentos de fibronectina derivados de la degradación enzimática u obtenidos mediante splicing alternativo están asociados a ciertos estados patológicos, y que poseen funciones biológicas bien diferenciadas (Magnusson & Mosher (1998) *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.*, 18:1363-1370; Labat-Robert (2002) *Semin. Cancer Biol.*, 12:187-195; Homandberg (1999) *Front Biosci.*, 4:D713-730).

Se evaluó la capacidad de la Fc-TEM-1 para unirse a diferentes fragmentos de fibronectina. Se diluyeron cantidades equimolares de proteínas en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,4), se añadieron a una placa de ELISA (Greiner Bio-one, Monroe, Carolina del Norte, Estados Unidos), y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Todas las placas se bloquearon con tampón de ensayo (BSA al 0,5%, Tween-20 al 0,5% en PBS) durante 2 horas, antes de la adición de la Fc-TEM-1. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se añadió durante 1 hora anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pensilvania, Estados Unidos). El revelado del color se evaluó usando el sustrato para peroxidasa TMB (tetrametilbencidina) SureBlue™ (KPL, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos). A fin de evaluar la integridad de las proteínas fibronectina recubiertas, se usó anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la fibronectina (FN Ab, por sus siglas en inglés) para asegurarse, mediante detección, de que todos los fragmentos de FN fuesen reconocibles y estuviesen recubiertos de manera uniforme.

Se compró fibronectina de longitud completa purificada de plasma humano, así como proteínas fragmento de FN de 120 kDa de unión a células, a la empresa Chemicon Intl. (Temucula, California, Estados Unidos); además, se compraron los fragmentos proteolíticos de 30 kDa, 45 kDa y 70k Da a la empresa Sigma (St. Louis, Misuri, Estados Unidos), y los fragmentos de fibronectina humana recombinante 2 y 4 (FN2 y FN4, respectivamente) a la empresa R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos).

Como se ilustra en la Figura 7A, la Fc-TEM1 se une al fragmento aminoterminal de 70kDa de la FN y a los productos de la escisión proteolítica de dicho fragmento (fragmentos de 45 kDa y de 30 kDa). El grado de unión a los diferentes fragmentos varió, y fue inferior al observado con la FN entera. En cambio, la Fc-TEM1 no se unió al fragmento de 120 kDa de la FN ni a los fragmentos recombinantes Fn2 o Fn4. Es improbable que esa ausencia de unión se debiese a un recubrimiento no uniforme o una degradación, puesto que todos los fragmentos de FN fueron detectados intensamente por un anticuerpo policlonal anti-FN. Estos hechos constituyen una evidencia de que el dominio de la FN implicado en la interacción con la endosialina reside dentro la porción aminoterminal de 70 kDa. A fin de determinar si la capacidad de unión reducida que se observa tras la digestión adicional del fragmento de 70 kDa indica que la Fc-TEM1 se une a una región situada muy cerca del sitio de escisión proteolítica o si la TEM1 reconoce epítomos conformacionalmente dependientes dentro del extremo aminoterminal de la FN que es alterado tras la digestión adicional, se analizó la capacidad de la Fc-TEM1 para unirse a formas reducidas de proteínas FN. Mientras que el anticuerpo anti-FN fue capaz de reconocer la FN reducida, lo que indica un recubrimiento equivalente, la unión a la Fc-TEM1 desapareció, como se ilustra en la Figura 7B. De manera similar a lo que ocurrió con la FN entera, el anticuerpo anti-endosialina M4 bloqueó la unión de la Fc-TEM1 al fragmento de 70 kDa de manera dependiente de dosis (Figura 7C), mientras que un anticuerpo isotipo de control no tuvo efecto alguno (Figura 7D). Estos resultados indican que la Fc-TEM1 reconoce epítomos conformacionalmente dependientes situados dentro del extremo aminoterminal de la FN y que pueden resultar alterados tras una degradación proteolítica adicional.

#### Ejemplo 8

##### Asociación de la fibronectina de superficie celular con la endosialina

Se generaron células CHO-TEM1 que expresan de manera estable la endosialina (hecho verificado mediante FACS con el anticuerpo M4; no se muestran los datos). Las células CHO-K1 se mantuvieron en RPMI suplementado con L-glutamina, un mínimo de un 1% de aminoácidos esenciales, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, y FBS al 10% inactivado térmicamente (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Se electroporaron células CHO-K1 ( $3 \times 10^6$ ) (ATCC, Manassas, Virginia, Estados Unidos) con 10  $\mu$ g de ADN de plásmido linearizado en una cubeta de electroporación de 0,4 mm. Se administró un impulso de 170V/1000  $\mu$ F usando un dispositivo GENE PULSER (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos). Se dejó que las células electroporadas se recuperasen durante 24 horas; después, se seleccionaron los clones resistentes a la blasticidina (5  $\mu$ g/ml). Se verificó la expresión de la endosialina mediante FACS y se seleccionaron las células que mostraban una expresión alta de la endosialina.

Se analizó el nivel de FN de superficie celular mediante citometría de flujo en células CHO-K1 parentales y células CHO-TEM1, usando un anticuerpo policlonal anti-FN. Las células se cosecharon en tampón de disociación celular (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), se lavaron, y se resuspendieron en PBS + FBS al 1% helados. Las células se incubaron durante 1 hora en hielo con el anticuerpo primario (M4 [10  $\mu$ g/ml]), se lavaron, se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-humano conjugado con FITC ([fluoresceín isotiocianato] Southern Biotech, Birmingham, Alabama, Estados Unidos), y se analizaron en un citómetro de flujo EASYCYTE (Guava Technologies, Hayward, California, Estados Unidos). Se observaron constantemente niveles un 15-20% superiores de FN de superficie en las células CHO-TEM1, comparados con los de las células CHO-K1 (no se muestran los datos). Se analizó la asociación de la FN de superficie celular con la endosialina.

Usando un anticuerpo anti-FN, se inmunoprecipitó la FN de lisados de CHO-K1 y de lisados de CHO-TEM1; después, se realizó un "Western blot" (una electroinmunotransferencia) usando el mismo anticuerpo o un anticuerpo anti-TEM1 (M4). Las células ( $10^7$ ) se lisaron en tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NP-40 al 1%, desoxicolato sódico al 0,5%, NaCl 150 mM, dodecilsulfato sódico al 0,1% [SDS]) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas "Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail" (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos), y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos para retirar los residuos. Se lavaron perlas de flujo rápido "Protein G Sepharose 6 Fast Flow Beads" ([sefaroza 6 con proteína G], Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos) 3 veces con PBS, y se capturó anticuerpo anti-FN (1  $\mu$ g) mediante basculación suave a 4 °C. Se pre-clarificaron cantidades iguales de proteína por muestra, mediante adición de proteína G no unida. Tras 2 horas de incubación, se retiró la proteína G, el sobrenadante se añadió al complejo anticuerpo-sefaroza, y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Tras lavado a fondo con tampón RIPA, se retiró, mediante ebullición durante 10 minutos en tampón para muestras NuPAGE® LDS (Invitrogen) que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, la proteína unida. Se separaron las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE sobre un gel de Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen); después, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno). Se llevó a cabo inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales de conejo específicos de la fibronectina (Abcam, Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos) o de la endosialina (Morphotek, Inc., Exton, Pensilvania, Estados Unidos); después, se detectaron dichos anticuerpos con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP, y se visualizaron usando sustrato quimioluminiscente SUPERSIGNAL West Pico (Pierce,

Rockford, Illinois, Estados Unidos). Asimismo, se monitorizaron mediante Western blot la integridad y la pureza de la Fc-TEM1 soluble. Se hirvió la proteína (5 µg) durante 5 minutos en tampón para muestras NUPAGE LDS 4x (Invitrogen) que contenía β-mercaptoetanol al 5%; después, la proteína hervida fue sometida a electroforesis en un gel NUPAGE de Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen) y transferida a una membrana de PVDF, y se realizó inmunotransferencia de la manera antes descrita.

Se descubrió que la FN puede inmunoprecipitar la endosialina de lisados de CHO-TEM1 (no se muestran los datos). En cambio, en los lisados de células inmunoprecipitados con una IgG normal que no se unió a la FN, no se pudo detectar endosialina (no se muestran los datos). Al menos dos enfoques diferentes (ELISA y co-inmunoprecipitación) proporcionan sólidas evidencias de la interacción entre la FN y la endosialina. Se obtuvieron resultados similares usando células HEK-293T que expresan ectópicamente la endosialina (no se muestran los datos).

#### Ejemplo 9

Células que expresan la endosialina, cultivadas sobre MATRIGEL, forman estructuras tipo malla

Si bien no se observaron diferencias en cuanto al crecimiento o a la supervivencia entre las células CHO-K1 parentales y las células CHO-TEM1 cultivadas sobre una superficie de plástico, se observó una morfología radicalmente diferente cuando dichas células se cultivaron sobre MATRIGEL. Las células CHO-K1 parentales crecieron formando racimos aislados de células con protuberancias mínimas tras 2 días de cultivo (Figura 8, paneles superiores), mientras que las células CHO-TEM1 crecieron en forma de racimos que conformaron una red tipo malla (Figura 8, panel inferior izquierdo). Además, las células CHO-TEM1 comprendidas dentro de cada racimo mostraron protuberancias que se estiraban hacia los otros racimos (Fig. 8, panel inferior derecho). Con el tiempo, las células CHO-TEM1 se fueron moviendo hasta situarse más cerca entre sí, formando racimos de mayor tamaño (no se muestran los datos); no así las células CHO-K1.

#### Ejemplo 10

La expresión de la endosialina aumenta la adhesión celular a la fibronectina y al extremo N-terminal de 70 kD o de 30 kD de la fibronectina

A fin de evaluar la adhesión a los fragmentos de la FN, se pre-recubrieron cantidades equimolares de fragmentos de la proteína durante toda la noche, y después, se bloquearon durante 2 horas con PBS que contenía 10 mg/ml de BSA. El MATRIGEL sirvió de control positivo. Células CHO-K1 o CHO-TEM1 ( $1,5 \times 10^5$  células/pocillo) cosechadas en tampón de disociación celular se lavaron y se suspendieron en PBS que contenía  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ , se añadieron por cuadruplicado a un kit de adhesión celular "ECM Cell Adhesion Array Kit" (Millipore) o se colocaron en placas revestidas individualmente de FN, LN, Gel y Col I (BD Biosciences), y se dejó que se adhiriesen durante 1 hora. Tras la incubación, se lavó cada pocillo 5 veces con PBS, y se midió la viabilidad usando CellTiter-Glo®. En caso oportuno, las células se pre-incubaron con anticuerpo durante 1 hora, antes del inicio del ensayo. Como se ilustra en la Figura 9A, la cantidad de células CHO-TEM1 adherentes fue 6 veces superior a la cantidad de células CHO-K1 parentales, en los pocillos revestidos de FN. No se observaron diferencias significativas entre la adhesión de las células CHO-K1 y de las células CHO-TEM1 en superficies revestidas de laminina o de vitronectina, mientras que la adhesión a los colágenos y a la tenascina fue demasiado débil para poder evaluar la existencia de diferencias significativas (Figura 9A). Tras pretratar las células CHO-TEM1 con anticuerpo M4, se observó una reducción del 50% en la adhesión celular dependiente de TEM1-FN, mientras que el anticuerpo IgG de control no tuvo efecto alguno (Figura 9B). El tratamiento con anticuerpo M4 no afectó a la adhesión celular dependiente de FN, independiente de endosialina (adhesión de referencia) de las células CHO-K1 parentales.

Se pre-revistieron las placas con cantidades equimolares de FN entera, fragmentos obtenidos mediante proteólisis de la FN ("fragmentos proteolíticos de FN"), y MATRIGEL. En las células CHO-TEM1 aumentó de 3 a 5 veces la adhesión a los fragmentos de 70 kDa y de 30 kDa de la FN, en comparación con las células CHO-K1 parentales, mientras que no se observó adhesión significativa alguna a los fragmentos de 45 kDa o Fn2. Las células CHO-TEM1 se unieron a MATRIGEL cinco veces mejor (más) que las células CHO-K1 (Figura 9C). Estos datos indican que la endosialina aumenta la adhesión de las células a las matrices extracelulares, y que el extremo aminoterminal de la FN está implicado en esas interacciones.

#### Ejemplo 11

La endosialina se une al colágeno I y el anticuerpo M4 inhibe dicha unión

Se usó una placa de 96 pocillos pre-revestida de colágeno I para evaluar la capacidad del anticuerpo M4 para bloquear la unión a la Fc-TEM-1. La placa se bloqueó con tampón de ensayo (BSA al 0,5%, Tween-20 al 0,5% en PBS) durante 2 horas, antes de la adición de proteína a la concentración indicada (µg/ml). Se pre-incubó la Fc-TEM-1 durante 1 hora a 4 °C con los anticuerpos M4 o isotipo humano (IgG humana). Después, se añadió el complejo proteína/anticuerpo a la placa revestida de Col I, y se dejó que se adhiriese durante 1 hora a temperatura ambiente; después, se lavaron las placas y se añadió durante 1 hora anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) humana conjugado con HRP (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pensilvania, Estados Unidos). El revelado del color se evaluó usando el sustrato para peroxidasa TMB (tetrametilbencidina) SureBlue™ (KPL, Gaithersburg, Maryland,

Estados Unidos). Como se ilustra en la Figura 10, la sobreexpresión de la endosialina ocasiona una mayor unión celular al COL I, que puede ser bloqueada por inhibidores de la endosialina tales como el anticuerpo M4, a diferencia de los controles tales como IgG inespecífica, que no pueden. El anticuerpo RbtTEM1 también suprimió la unión de la Fc-TEM1 al Col I (no se muestran los datos).

#### 5 Ejemplo 12

La endosialina aumenta la adhesión celular al colágeno

Se lavaron células CHO-K1 o CHO-TEM1 ( $1,5 \times 10^5$  células/pocillo) y se suspendieron en PBS que contenía  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ; después, se añadieron por cuadruplicado a una placa de 96 pocillos revestida de Colágeno I y se dejó que se adhiriesen durante los períodos de tiempo indicados. Después de dejar que las células se adhiriesen, la placa se lavó 5 veces con PBS, y se midió la viabilidad usando CellTiter-Glo®. Como se ilustra en la Figura 11, la sobreexpresión de la endosialina ocasiona una mayor unión celular al COL I.

#### Ejemplo 13

Prueba de migración celular

Se usaron el sistema "BD BioCoat Tumor Invasion System™" (BD Bioscience) e insertos de cultivo celular de fibronectina humana (BD Bioscience) para evaluar la migración de células mediada por la TEM1. Se cosecharon las células con un tampón de disociación celular no enzimática, y se diluyeron hasta una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml en medio de crecimiento suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 2%; después, se añadieron 500  $\mu$ l de suspensión celular a la cámara superior del inserto con membrana. A fin de crear un gradiente, se añadió, a la cámara inferior, medio de crecimiento que contenía FBS al 20%. Las células se incubaron durante 48 horas; después, se retiró el inserto, y las células que habían migrado a través de la membrana recubierta se contaron usando CELLTITER-GLO (Promega). Las células se pre-trataron con anticuerpo, como se indica en la descripción de la Figura 12, y se evaluó la migración en presencia continua de anticuerpo. A fin de examinar la formación de túbulos sobre MATRIGEL, se añadieron las células ( $8 \times 10^4$  células/pocillo) a una placa de 96 pocillos revestida de MATRIGEL (BD Bioscience), se incubaron durante toda la noche y se fotografiaron a 200x-400x aumentos.

Como se ilustra en la Figura 12A, las células CHO-K1 mostraron una migración celular modesta, mientras que las células CHO-TEM1 mostraron una migración celular aumentada más de 10 veces. El tratamiento con anticuerpo M4 suprimió la migración celular de las células CHO-TEM1; no así el tratamiento con IgG de control. Se observaron resultados similares en experimentos de migración en los que se usaron cámaras Transwell® recubiertas con FN (Figura 12B).

#### 30 Ejemplo 14

La endosialina aumenta la actividad de la MMP-9

Se ha demostrado que la endosialina, la MMP-2 y el COL IV están colocalizados en áreas tisulares caracterizadas por las protuberancias similares a dedos de los procesos angiogénicos tempranos (Virgintino *et al.* (2007) *Angiogenesis*, 10:35-45). A fin de evaluar la actividad de las MMPs, se sembraron células en una placa de 6 pocillos, y se les privó de suero durante 48 horas. El sobrenadante del cultivo se recogió y se clarificó mediante centrifugación (13.000 rpm, 15 minutos) a 4 °C a fin de retirar los residuos. Se sometieron a zimografía con gelatina y caseína cantidades iguales de proteína en condiciones no reductoras (Invitrogen), conforme al protocolo del fabricante. Se usaron los controles positivos MMP-2 humana y MMP-9 (Chemicon, International) como indicadores de la migración de la MMP-2 y de la MMP-9, y como referencia para nuestros sobrenadantes de células CHOK1 y CHO-TEM-1. Como se ilustra en la Figura 13, la actividad de la MMP-9 aumentó significativamente en las células CHO-TEM1, en comparación con lo que ocurrió en las células CHO-K1 parentales. La actividad aumentada de la MMP-9 se correlacionó con un aumento de la secreción de la proteína MMP-9 en el sobrenadante de las células CHO-TEM1, conforme a lo medido mediante una prueba ELISA específica de MMP (no se muestran los datos). De estos datos se desprende que la secreción de MMP-9 inducida contribuye a la mayor capacidad de migración de las células CHO-TEM1 a través de cámaras Transwell® recubiertas de MATRIGEL y de FN, conforme a lo que se indica en la presente invención.

#### Ejemplo 15

La endosialina aumenta la actividad de la  $\beta$ -integrina

Las integrinas (por ejemplo,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ) son receptores, bien caracterizados, que median la adhesión celular dependiente de FN (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer 2003; Magnusson & Mosher 1998). Además, se ha descrito funcionalmente un receptor celular no identificado que se une a la región N-terminal de 70 kDa de la FN (McKeown-Longo & Mosher (1983) *J. Cell Biol.*, 97:466-472) y que resulta necesario para exponer el crítico sitio de unión a las integrinas (motivo RGD) de la FN soluble implicado en las interacciones FN-integrina y FN-FN (Tomasini-Johansson *et al.* (2006) *Matrix Biol.*, 25:282-293; McKeown-Longo & Mosher (1985) *J. Cell Biol.*, 100:364-374). En la presente invención se identifica a la endosialina como un receptor novedoso que interacciona con la región N-

terminal de 70 kDa de la FN y que aumenta la adhesión celular dependiente de FN. La mayor unión de la FN medida en estos sistemas celulares *in vitro* podría ser el resultado de una interacción secuencial con la endosialina y con las integrinas.

Se transfectaron células HEK293 (células embrionarias de riñón humano 293) con un vector que expresa la endosialina o ADNc simulado. Se confirmó que dichas células expresaban la endosialina de superficie celular (293TEM1), mientras que las células transfectadas con la simulación (293T) no la expresaban. Después, se analizó la capacidad de las células para aumentar la expresión de las integrinas y la actividad de las integrinas en presencia del anticuerpo M4. La Figura 14B muestra que la sobreexpresión de la endosialina ocasiona un aumento de la actividad de la integrina  $\beta 1$ , en comparación con las células de control. La Figura 14A muestra que la expresión de la integrina  $\beta 1$  de superficie celular no varía. El tratamiento de las células con el inhibidor de la endosialina anticuerpo M4 suprimió la actividad de las integrinas; en cambio, no se observó efecto alguno sobre los niveles en la superficie celular (Figura 14B). Sin ánimo de limitación a ninguna teoría concreta, es posible que la interacción entre la endosialina y el fragmento N-terminal de 70 kDa de la FN soluble sea responsable de la iniciación del ensamblaje de la FN, que produce una forma multimérica de afinidad alta, capaz de unirse a las integrinas.

#### Ejemplo 16

El anticuerpo M4.1 reconoce la TEM-1 humana no reducida, pero no la TEM-1 murina

Se cultivaron células CHO-TEM-1, células 2H11 murinas, células CHO-K1 parentales, células NS0 murinas y células MS1 murinas en RPMI1640 completo (RPMI1640; piruvato sódico; aminoácidos no esenciales; L-glutamina, y FBS; Invitrogen Corp.). Se cultivaron pericitos primarios humanos en medio para pericitos (500 ml de medio basal (N.º Cat. 1201), 10 ml (2%) de suero fetal bovino (FBS, N.º Cat. 0025), 5 ml de suplemento de crecimiento para pericitos (PGS por sus siglas en inglés, N.º Cat. No. 1252) y 5 ml de solución de penicilina/estreptomina (P/S, N.º Cat. 0503); Invitrogen Corp.). Se hicieron crecer las células a 37 °C y en CO<sub>2</sub> al 5% en un incubador humidificado. Las células se desadhirieron con "TrypLE™ Select" (Invitrogen Corp., N.º de catálogo 12563-011), se lavaron, y se contaron. Se lisaron dichas células a una concentración de 2 x 10<sup>7</sup> células en tampón de lisis RIPA que contenía inhibidores de las proteasas, y se incubaron sobre hielo durante 10 minutos. Se aglomeró el material insoluble a 10.000xG durante 10 minutos a 4 °C, y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Se mezclaron alícuotas con un volumen igual de tampón de carga de proteína 2X, con o sin 2-mercaptoetanol al 10% (sustancia reductora). Se cargaron 15  $\mu$ l (1,5 x 10<sup>5</sup> células) de lisado en un gel SDS-PAGE con Bis/Tris al 4-12%, de 15 pocillos, y se realizó la electroforesis de dichos 15  $\mu$ l de lisado durante 30 minutos a 200V en tampón de electroforesis MES. Se efectuó electrotransferencia del gel sobre PVDF; después, se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente, con basculación, en TBST-leche (M-TBST) al 5%. Se aplicó, a las electrotransferencias de M4.1, anticuerpo M4.1 en M-TBST al 5% a una concentración de 3,3  $\mu$ g/ml, durante toda la noche a 4 °C.

A las electrotransferencias de anticuerpo policlonal de conejo anti-tem-1 se les aplicó una dilución 1:300 (4,5 mg/ml de caldo, N.º de lote NB487-76) de anticuerpo en M-TBST al 5%, durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo M4.1, a semejanza del anticuerpo M4, es un anticuerpo humanizado anti-endosialina humana. Se lavaron las membranas 5 veces, durante 5 minutos cada vez, con 30 ml de TBST a temperatura ambiente. Se diluyó anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) humana conjugado con HRP (Jackson Immuno, 1 mg/ml de caldo) al 1:20000 en M-TBST al 5%, como anticuerpo secundario, para aplicarlo a las electrotransferencias de M4.1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó anticuerpo secundario de cabra anti-anticuerpo (H+L) de conejo, conjugado con HRP, a las electrotransferencias de anti-TEM-1 policlonal, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas 5 veces, durante 5 minutos cada vez, con 30 ml de TBST a temperatura ambiente. Se detectó la señal mediante quimioluminiscencia usando el sistema de detección "Femto Western Blot Detection System" (Pierce), conforme a las instrucciones del manual correspondiente.

Como se ilustra en la Figura 15, el anticuerpo M4.1 reconoce la TEM-1 no reducida humana en células CHO-TEM-1 y en pericitos primarios humanos, pero no reconoce la TEM-1 murina (SEC N.º ID: 2) en células 2H11 de ratón (Figura 15). En cambio, el anticuerpo policlonal de conejo anti-TEM-1 humana (rabPAb TEM-1) reconoce la TEM-1 humana en células CHO-TEM-1 y en pericitos humanos, y también a TEM-1 murina en células 2H11 de ratón. Ni el anticuerpo M4.1 ni el anticuerpo rabPAb TEM-1 reaccionaron contra lisados de células CHO-K1 parentales ni contra células NS0 o MS1 murinas, a raíz de la ausencia de expresión de la TEM-1 en dichas células. Únicamente el anticuerpo rabPAb TEM-1 reaccionó contra la TEM-1 reducida humana, aunque en menor grado en comparación con la TEM-1 no reducida.

La presente invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas hasta aquí, sino que puede ser objeto de variaciones y de modificaciones, de conformidad y dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

**Listado de secuencias**

<110> Morphotek, Inc. Zhou, Yuhong Tomkowicz, Brian Grasso, Luigi Nicolaidis, Nicholas Sass, Philip M.

<120> MÉTODOS PARA INHIBIR LA UNIÓN DE LA ENDOSIALINA A LIGANDOS

<130> MOR-0727

5 <150> US 60/910,362  
<151> 2007-04-05

<150> US 60/980,026  
<151> 2007-10-15

<160> 35

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2660

<212> DNA

<213> Mus musculus

15 <400> 1

```

gtcaagagca gcggcaggcc cgagccgggc cagtccgggg gcgtcgcgat gctgctgcgc      60
ctgctgctgg cctgggtggc cgcggtgccc gactggggcc aggtcccctg gacgccggag      120
cctcgagccg cgtgcccggc cagcagctgc tacgcgctct ttcccggcg ccgcacattc      180
ctggaagctt ggcgggcgtg ccgcgaattg gggggcaacc tggccacacc gcggacccca      240
gaggaggccc agcgtgtgga cagcctgggtg ggggtcgggc cggccaacgg gctgctatgg      300
attgggttgc agcggcaggc taggcaatgc cagccgcagc gccactgcg gggcttcata      360
tggaccacgg gagaccagga caccgccttc accaactggg cccagccggc tacggaagga      420
ccctgccag cccagcgtg tgcagccctt gaggccagcg gagagcatcg ctggctcgaa      480
ggctcgtgca cactggctgt cgatggctac ctctgccagt ttggttttga gggtgctgc      540
cctgccttgc cgcttgaggt gggtcaggcc ggtcccgtg tctacaccac acccttcaac      600
ctggtttcca gcgagttcga atggctgccc tttggctccg tggcagctgt gcagtgccaa      660
gctggcaggg gagcttctct gctgtgcgtg aaacagcctt caggtggcgt gggctgggcc      720
cagactggcc cgctgtgccc agggactggc tgtggtcctg acaatggggg ttgcgaacat      780
gagtgtgtgg aagaggtgga cgggtgctgt tcctgccgct gcagtgaagg cttccgtcta      840
gcagcagatg ggcacagttg tgaagacccc tgtgccagg ccccctgtga gcagcagtgt      900
gaacctggag ggccacaagg ctatagctgc cactgtcgcc ttggcttccg gccagctgag      960
gatgatccac accgctgcgt ggacacggat gagtgccaga ttgctggtgt gtgccagcag     1020
    
```

ES 2 606 906 T3

atgtgtgtca actatggttg tggctttgag tgttactgca gcgaggggtca cgagcttgag 1080  
gcagatggta tcagctgtag ccctgcagga gccatgggtg cccaggcttc ccaggatctc 1140  
agagatgagt tgctggatga tggagaagaa ggggaggatg aagaggagcc ctgggaggac 1200  
tttgatggca cctggacaga ggaacagggg atcctatggc tggcacctac acatccacct 1260  
gactttggcc tgccctatag gcccaacttc ccacaggatg gagagcctca gagattgcac 1320  
ctggagccta cctggccacc ccacttagt gccccaggg gccctacca ctctcagtg 1380  
gtgtctgcca cacggcccat ggtgatctct gccactcgac ccacactacc ttctgcccac 1440  
aagacctctg ttatttcagc tacacgcca cccctgagcc ctgtccaccc acctgccatg 1500  
gcccctgcca cacctccagc tgtgttctct gagcaccaga tccccaaaat caaggccaat 1560  
tatccagacc tgcccttttg ccacaagcct gggataacct cggccactca cccagcacgg 1620  
tctctccgt accagcccc cattatctca accaactatc cccaagtctt ccctccccac 1680  
caggccccta tgtctccaga taccacact atcacttatt tgctccagt cccccctcac 1740  
cttgatcctg gggataccac ttctaaagcc catcaacacc ctttgcctcc agatgctcca 1800  
ggatcagaa cccaggcccc ccagctttct gtctcagctc tccagcccc tcttctacc 1860  
aactccaggt cttctgtcca tgaaactcct gtgcctgctg ccaaccagcc cccagccttc 1920  
ccttcttctc ccctcccccc tcagaggccc actaaccaga cctcatctat cagccctaca 1980  
cattcctatt ccagagcccc tctagtcca aggaaggag tcccagctc caaatcagtg 2040  
ccacagctgc cctcgggtgc ctccacagca gctccaacag ccctggcaga gtcaggtctt 2100  
gcaggccaaa gccaaagga tgaccgctgg ctgctgggtg cactcctggt gccaacatgt 2160  
gtcttcttgg tgggtgctgt tgccctgggc attgtgtact gcactcgtg tggctcccac 2220  
gcaccaaca agcggatcac ggactgctat cgctgggtca cacatgctgg gaacaagagc 2280  
tcaacagaac ccatgcccc cagaggcagc cttacagggg tacagacctg tagaaccagt 2340  
gtgtgatggg gtgcagatgc ccctttgtgg gatagaagaa aaggacttgc tttggacaca 2400  
tggctgagac cacaccaagg acttatgggg gctgccagc tgacagagga ggttctgttc 2460  
tttgagccca gcatccatgg caaaggacac accaggactc caggacctca aggggtgggt 2520  
gctgggatct tctccaataa atgggggtgcc aacctaccc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2580  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2660

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

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



# ES 2 606 906 T3

agtccggggg catcgcgatg ctgctgcgcc tgttgctggc ctgggcggcc gcagggccca	60
cactgggcca ggaccctg gctgctgagc cccgtgccgc ctgcggcccc agcagctgct	120
acgctctctt cccacggcgc cgcaccttc tggaggcctg gcgggcctgc cgcgagctgg	180
ggggcgacct ggccactcct cggaccccc aggaggccca gcgtgtggac agcctggtgg	240
gtgctggccc agccagccgg ctgctgtgga tcgggctgca gcggcaggcc cggcaatgcc	300
agctgcagcg cccactgcgc ggcttcacgt ggaccacagg ggaccaggac acggctttca	360
ccaactgggc ccagccagcc tctggaggcc cctgcccgcc ccagcgtgt gtggccctgg	420
aggcaagtgg cgagcaccgc tggctggagg gctcgtgcac gctggctgtc gacggctacc	480
tgtgccagtt tggcttcgag ggcgcctgcc cggcgtgca agatgaggcg ggccaggccg	540
gccagccgt gtataccacg cccttcacc tggctccac agagtttgag tggctgcct	600
tcggctctgt gcccgctgtg cagtgccagg ctggcagggg agcctctctg ctctcgtga	660
agcagcctga gggaggtgtg ggctgtcac gggctgggcc cctgtgcctg gggactggct	720
gcagccctga caacgggggc tgcgaacacg aatgtgtgga ggaggtggat ggtcacgtgt	780
cctgccgctg cactgagggc ttccggctgg cagcagacgg gcgcagttgc gaggaccct	840
gtgccagggc tccgtgcgag cagcagttgt agcccgggtg gccacaaggc tacagctgcc	900
actgtgcct gggtttccgg ccagcggagg atgatccgca ccgctgtgtg gacacagatg	960
agtgccagat tgccgggtgtg tgccagcaga tgtgtgtcaa ctacgttggg ggcttcgagt	1020
gttattgtag cgagggacat gagctggagg ctgatggcat cagctgcagc cctgcagggg	1080
ccatgggtgc ccaggcttcc caggacctcg gagatgagtt gctggatgac ggggaggatg	1140
aggaagatga agacgaggcc tgggaagcct tcaacgggtg ctggacggag atgcctggga	1200
tcctgtggat ggagcctacg cagccgcctg actttgccct ggcctataga ccgagcttcc	1260
cagaggacag agagccacag atacctacc cggagcccac ctggccaccc ccgctcagtg	1320
ccccagggt cccctaccac tcctcagtg tctccgtcac ccggcctgtg gtggtctctg	1380
ccacgcatcc cacactgcct tctgccacc agcctcctgt gatccctgcc acacaccag	1440
ctttgtccc tgaccaccag atccccgtga tcgcagccaa ctatccagat ctgccttctg	1500
cctaccaacc cggatttctc tctgtctctc attcagcaca gcctcctgcc caccagcccc	1560
ctatgatctc aaccaaatat ccggagctct tcctgccca ccagtcccc atgtttccag	1620

ES 2 606 906 T3

acaccgggt cgctggcacc cagaccacca ctcatattgcc tggaatccca cctaaccatg 1680  
cccctctggt caccaccctc ggtgccccagc taccacctca agccccagat gcccttgtcc 1740  
tcagaaccca ggccaccag cttcccatta tcccactgc ccagccctct ctgaccacca 1800  
cctccaggtc cctgtgtct cctgccatc aaatctctgt gcctgctgcc acccagcccg 1860  
cagccctccc caccctctg ccctctcaga gcccactaa ccagacctca cccatcagcc 1920  
ctacacatcc ccattccaaa gcccccaaaa tcccaggga agatggcccc agtcccaagt 1980  
tggccctgtg gctgccctca ccagctccca cagcagcccc aacagccctg ggggaggctg 2040  
gtcttgccga gcacagccag agggatgacc ggtggctgct ggtggcactc ctggtgccaa 2100  
cgtgtgtctt tttggtggtc ctgcttgac tgggcatcgt gtactgcacc cgctgtggcc 2160  
cccatgcacc caacaagcgc atcactgact gctatcgtg ggtcatccat gctgggagca 2220  
agagcccaac agaaccctat cccccaggg gcagcctcac aggggtgcag acctgcagaa 2280  
ccagcgtgtg atgggggtgca gacccccctc atggagtatg gggcgctgga cacatggccg 2340  
gggctgcacc agggaccat gggggctgcc cagctggaca gatggcttcc tgctcccag 2400  
gcccagccag ggtcctctct caaccactag acttggctct caggaactct gcttctggc 2460  
ccagcgtctg tgaccaagga tacaccaaag cccttaagac ctcagggggc ggggtgctggg 2520  
gtcttctcca ataatgggg tgtcaacctt acccaaggaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2576

<210> 4

<211> 757

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Leu Arg Leu Leu Leu Ala Trp Ala Ala Ala Gly Pro Thr Leu  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ser Glu Gly His Glu Leu Glu Ala Asp Gly Ile Ser Cys Ser Pro



ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Thr Ser Val  
755

<210> 5

<211> 2397

<212> DNA

5 <213> Rattus rattus

<400> 5

atgctgctgc gcctgctgct ggcctgggcg gccgcggtgc ccgcactggg ccaggccccc 60  
tggacgccgg agcctagagc cgcctgcggc cccagcagct gctacgctct ctttccccgg 120  
cgccgcacat tcctggaggc ttggcggtcg tgccgcgaat tggggggcaa cctggccaca 180  
ccgaggaccc cggaggaggc ccgacgtgtg gacagcctgg tgggcgtcgg acccgccaac 240  
gggctgctat ggattgggtt gcagcggcag gctcggcaat gccagccaca gcgcccactg 300  
cggggcttca tatggaccac gggagaccag gacaccgct tcaactactg ggcccagccg 360  
gctacggaag gaccctgccc ggcccagcgc tgtgctgccc ttgaggccag cggagaacat 420

ES 2 606 906 T3

cgctggctcg aaggctcgtg cactctggct gtcgatggct acctctgccca gtttggtttt 480  
 gaggggtgcct gtccctgcctt gccgcttgag gtgggccaag ccggtccagc tatctacacc 540  
 acacccttca acctggtttc cagtgagttc gaatggctac cctttggctc cgtggcagct 600  
 gtgcagtgcc aagctggcag gggaaactct ctgttgtgtg tgaacaacc ttcaggtggc 660  
 gttggctggc cccagactgg cccactgtgt ccagggactg gctgtggtcc tgacaatggg 720  
 ggttgcgaac atgaatgtgt ggaagagttg gatggcggtg tgcctgccg ctgcagtga 780  
 ggcttccgtc tagcagcaga tgggcacagt tgtgaagacc cttgtgccca ggccccctgt 840  
 gagcagcagt gtgagcctgg tgggccacaa ggctacagct gccactgtcg cctaggcttc 900  
 cggccagctg aggatgagcc acaccgctgc gtggacacgg atgagtgccca gattgctggt 960  
 gtgtgccagc agatgtgtgt caactatggt ggtggctttg agtgttactg cagggagggt 1020  
 catgagcttg aggcagatgg tatcagttgt agccctgcag gagctatggg tgcccaggct 1080  
 tcccaggatc ttagagacga gttgctggat gatggagaag aaggggagga tgaagaggag 1140  
 ccctgggagg acttcgatgg cacctggaca gaggagcagg ggaccctatg gatggcacct 1200  
 acacatccgc ctgactttgg cctgcccctat aggcccaact tcccacagga tggagagcct 1260  
 cagagattgc acctggagcc tacctggcca cccccactta gcgccccag gggccccctac 1320  
 cactcctcag tgggtgtctgc cacacggccc atggtaatct ctgccactcg acccacacaa 1380  
 ccttctgccc gaaagacctc tgttatttca gccacacacc tacccttaa ccctgtccac 1440  
 ccacctgccc tagcccctac cacacctcca gccgtgctcc ctgagcacca gatccccaaa 1500  
 atcaaggcca gttatccaga cttgcctttt ggccacaagc ctgggataac ctcagccact 1560  
 caccagcac agcctcctcc tcaccagccc cccatcatct caacgaaata tcccgaagtc 1620  
 ttccctcccc agcaggcccc tatgtctcca gacaccaca ctatcactaa tttgccteta 1680  
 atcccatctc accttgacc tggggatacc acttcccaag ccggtcacca tcctttgctc 1740  
 ccagatgttc caggtatcag aaccaggct cccaggttt ctgtctcagc tctccagccc 1800  
 tctctgccta ccaactccag gtcttctgtc catgaacccc ctgtgcctac tgccaaccag 1860  
 cccccagcct tcccttctcc cctgccccct cagagcccca ttaaccagac ctcatctatc 1920  
 agccctacac actcctattc cagagcccct caggtcccaa ggaaggagc tcccagtcct 1980  
 aatcagtgca caaggctgca ctcagtggcc cccacagcag ctccaacagc cctggcagag 2040  
 ttgggtcttg cagggcaaaag ccagagagat gaccgatggc tgctggtggc actcttggtg 2100  
 ccaacgtgtg tcttcttggg ggtcctgctc gcattgggca ttgtgtactg cactcgtctg 2160  
 ggctcccata cgcccaacaa gcgtatcact gactgctatc gctgggtcac gcatgctggg 2220  
 aacaagagct caacagaacc catgcccccc agatggacag agaaggttct gttccttga 2280  
 cccagcattc atggcaaaag acacactgaa ggactccagg acctcaaggg gtgggtgctg 2340  
 ggatcttctc caataaatgg cgtgccaacc tcacccaaag tccgtgatcc ccgctga 2397

5 <210> 6  
 <211> 798  
 <212> PRT  
 <213> Rattus rattus  
 <400> 6

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 606 906 T3

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

ES 2 606 906 T3

705 710 715 720

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 705

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 7

```
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt cactccgac 60
atccagatga cccagagccc aagcagcctg agcgcacagc tgggtgacag agtgaccatc 120
acctgtagag ccagccagaa tgtgggtact gctgtagcct ggctacagca gaccccaggt 180
aaggctcaa agctgctgat ctactcggca tcgaatcggc aactggtgt gccaagcaga 240
ttcagcggta gcggtagcgg taccgactac acctcacca tcagcagcct ccagccagag 300
gacatcgcca cctactactg ccagcaatat accaactatc ccatgtacac gttcggccaa 360
gggaccaagg tgcaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
10 ctgagctogc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtaa 705
```

<210> 8

<211> 1422

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

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

<400> 8

ES 2 606 906 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccag 60  
gtccaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgagacctt gccagaccct gagcctgacc 120  
tgcaccgcgt ctggctacac cttcactgac tatgttatac actgggtgaa acagccacct 180  
ggacgaggtc ttgagtggat tggatatatt aatccttatg atgatgatac tacctacaac 240  
cagaagttca agggcagagt gacaatgctg gtagacacca gctccaacac agcctacctg 300  
agactcagca gcgtgacagc cgaggacacc gcggtctatt attgtgcaag aagggggaat 360  
tcctatgatg gttactttga ctactctatg gactactggg gatccgggac cccggtcacc 420  
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 480  
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540  
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 600  
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 660  
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720  
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc 780  
ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 840  
cggaccctcg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 900  
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960  
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg 1020  
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080  
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1140  
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1200  
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260  
cctcccgtgc tggactccga cggctcctt ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320  
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1380  
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cccgggaaat ga 1422

<210> 9

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 9

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 648

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 10

ES 2 606 906 T3

gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60  
 atcacctgta gagccagcca gaatgtgggt actgctgtag cctggctaca gcagacccca 120  
 ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcgaatc ggtacactgg tgtgccaagc 180  
 agattcagcg gtagcggtag cggtagcgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca 240  
 gaggacatcg ccacctacta ctgccagcaa tataccaact atcccatgta cacgttcggc 300  
 caagggacca aggtgcaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420  
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaaactcc 480  
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg 540  
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600  
 ggctgagct cgcccgctcac aaagagcttc aacaggggag agtggttaa 648

<210> 11

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 11

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

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

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

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

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

10

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 12

<211> 33

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica CDR1 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 12

agagccagcc agaatgtggg tactgctgta gcc 33

10 <210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 14

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 14

25 tcggcatcga atcggtacac t 21

<210> 15

<211> 7

# ES 2 606 906 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

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

<210> 16  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 16  
 cagcaatata ccaactatcc catgtacacg 30

15 <210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 20 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

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

<210> 18  
 <211> 294  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 18  
 gacatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60  
 atcacctgta gagccagcca gaatgtgggt actgctgtag cctggctaca gcagacccca 120  
 ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcgaatc ggtacactgg tgtgccaagc 180  
 agattcagcg gtagcggtag cggtaccgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca 240  
 30 gaggacatcg ccacctacta ctgccagcaa tataccaact atcccatgta cacg 294

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

35 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 19

# ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr

<210> 20

<211> 473

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 20

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asp Asp Thr Thr Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asn Ser Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr  
 115 120 125

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Ser Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala  
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 165 170 175

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

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
 210 215 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 225 230 235 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

ES 2 606 906 T3

245 250 255

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 21

<211> 1365

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 21

ES 2 606 906 T3

caggtccaac tgcaggagag cgggtccaggt cttgtgagac ctagccagac cctgagcctg 60  
 acctgcaccg cgtctggcta caccttcact gactatgtta tacactgggt gaaacagcca 120  
 cctggacgag gtcttgagtg gattggatat attaatcctt atgatgatga tactacctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcag agtgacaatg ctggtagaca ccagctcaa cacagcctac 240  
 ctgagactca gcagcgtgac agccgaggac accgcggtct attattgtgc aagaaggggg 300  
 aattcctatg atggttactt tgactactct atggactact ggggatccgg gaccccggtc 360  
 accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag 420  
 agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctgggtca aggactactt ccccgaaccg 480  
 gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctcg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540  
 ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600  
 ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660  
 aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 720  
 ctctctgggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac 780  
 tcccggacc ctagaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 840  
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900  
 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960  
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatogag 1020  
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080  
 tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1140  
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200  
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1260  
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320  
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctcccggga aatga 1365

<210> 22

<211> 454

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 22

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 23

<211> 1422

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 23

ES 2 606 906 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccag 60  
 gtccaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgagaccta gccagaccct gagcctgacc 120  
 tgcaccgcgt ctggctacac cttcactgac tatgttatac actgggtgaa acagccacct 180  
 ggacgaggtc ttgagtggat tggatatatt aatccttatg atgatgatac tacctacaac 240  
 cagaagttca agggcagagt gacaatgctg gtagacacca gctccaacac agcctacctg 300  
 agactcagca gcgtgacagc cgaggacacc gcggtctatt attgtgcaag aagggggaat 360  
 tcctatgatg gttactttga ctactctatg gactactggg gatccgggac cccggtcacc 420  
 gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 480  
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 540  
 acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 600  
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 660  
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720  
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccccagc acctgaactc 780  
 ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 840  
 cggaccctcg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 900  
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960  
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg 1020  
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080  
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1140  
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1200  
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260  
 cctcccgtgc tggactccga cggcttcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320  
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcagaggc tctgcacaac 1380  
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cccgggaaat ga 1422

<210> 24

<211> 473

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 24

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1

5

10

15

10

ES 2 606 906 T3

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

ES 2 606 906 T3

260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 25

<211> 1365

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 25

ES 2 606 906 T3

caggtccaac tgcaggagag cgggtccaggt cttgtgagac ctagccagac cctgagcctg 60  
 acctgcaccg cgtctggcta caccttcact gactatgtta tacactgggt gaaacagcca 120  
 cctggacgag gtcttgagtg gattggatat attaatcctt atgatgatga tactacctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcag agtgacaatg ctggtagaca ccagctcaa cacagcctac 240  
 ctgagactca gcagcgtgac agccgaggac accgcggtct attattgtgc aagaaggggg 300  
 aattcctatg atggttactt tgactactct atggactact ggggatccgg gaccccggtc 360  
 accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag 420  
 agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctgggtca aggactactt ccccgaaccg 480  
 gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540  
 ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600  
 ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660  
 aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 720  
 ctctctgggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac 780  
 tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 840  
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900  
 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960  
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatogag 1020  
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080  
 tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1140  
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200  
 acgcctcccg tgctggactc cgacggcttc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1260  
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320  
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctcccggga aatga 1365

<210> 26

<211> 454

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 26

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

1 5 10 15

10

ES 2 606 906 T3

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

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 27

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 27

ggctacacct tcaactgacta tgttatacac 30

10 <210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile His

1

5

10

<210> 29

ES 2 606 906 T3

<211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica CDR2 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1  
  
 <400> 29  
 tatattaatc cttatgatga tgatactacc tacaaccaga agtcaaggg c 51  
  
 <210> 30  
 <211> 17  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1  
  
 <400> 30  
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asp Asp Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
  
 15 Gly  
  
 <210> 31  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1  
  
 <400> 31  
 gcaagaagg ggaattccta tgatggttac tttgactact ctatggacta c 51  
  
 <210> 32  
 <211> 17  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de CDR3 de los anticuerpos M4 y M4.1  
  
 30 <400> 32  
 Ala Arg Arg Gly Asn Ser Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr Ser Met Asp  
 1 5 10 15  
  
 Tyr  
  
 <210> 33  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena pesada de los anticuerpos M4 y M4.1  
  
 <400> 33

ES 2 606 906 T3

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

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 34

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

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

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

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

10

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

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

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

Tyr

<210> 35

<211> 2477

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 35

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly Ala  
 115 120 125

Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu Gly  
 130 135 140

Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu Thr  
 145 150 155 160

ES 2 606 906 T3

Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu  
 165 170 175

Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp His Ala Ala Gly  
 180 185 190

Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Trp  
 195 200 205

Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile Thr  
 210 215 220

Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser Tyr  
 225 230 235 240

Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu Leu  
 245 250 255

Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu Arg  
 260 265 270

His Thr Ser Val Gln Thr Thr Ser Ser Gly Ser Gly Pro Phe Thr Asp  
 275 280 285

Val Arg Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro  
 290 295 300

Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met  
 305 310 315 320

Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu  
 325 330 335

Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly  
 340 345 350

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

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

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

Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser Asn



ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 606 906 T3

Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys Val Thr Ile Met Trp Thr  
 915 920 925  
 Pro Pro Glu Ser Ala Val Thr Gly Tyr Arg Val Asp Val Ile Pro Val  
 930 935 940  
 Asn Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg Leu Pro Ile Ser Arg Asn Thr  
 945 950 955 960  
 Phe Ala Glu Val Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr Tyr Phe Lys  
 965 970 975  
 Val Phe Ala Val Ser His Gly Arg Glu Ser Lys Pro Leu Thr Ala Gln  
 980 985 990  
 Gln Thr Thr Lys Leu Asp Ala Pro Thr Asn Leu Gln Phe Val Asn Glu  
 995 1000 1005  
 Thr Asp Ser Thr Val Leu Val Arg Trp Thr Pro Pro Arg Ala Gln  
 1010 1015 1020  
 Ile Thr Gly Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg Arg Gly Gln  
 1025 1030 1035  
 Pro Arg Gln Tyr Asn Val Gly Pro Ser Val Ser Lys Tyr Pro Leu  
 1040 1045 1050  
 Arg Asn Leu Gln Pro Ala Ser Glu Tyr Thr Val Ser Leu Val Ala  
 1055 1060 1065  
 Ile Lys Gly Asn Gln Glu Ser Pro Lys Ala Thr Gly Val Phe Thr  
 1070 1075 1080  
 Thr Leu Gln Pro Gly Ser Ser Ile Pro Pro Tyr Asn Thr Glu Val  
 1085 1090 1095  
 Thr Glu Thr Thr Ile Val Ile Thr Trp Thr Pro Ala Pro Arg Ile  
 1100 1105 1110  
 Gly Phe Lys Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro  
 1115 1120 1125  
 Arg Glu Val Thr Ser Asp Ser Gly Ser Ile Val Val Ser Gly Leu  
 1130 1135 1140  
 Thr Pro Gly Val Glu Tyr Val Tyr Thr Ile Gln Val Leu Arg Asp  
 1145 1150 1155

ES 2 606 906 T3

Gly Gln Glu Arg Asp Ala Pro Ile Val Asn Lys Val Val Thr Pro  
 1160 1165 1170

Leu Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr  
 1175 1180 1185

Gly Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile  
 1190 1195 1200

Thr Gly Tyr Arg Ile Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly  
 1205 1210 1215

Asn Ser Leu Glu Glu Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr  
 1220 1225 1230

Phe Asp Asn Leu Ser Pro Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr  
 1235 1240 1245

Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile  
 1250 1255 1260

Ile Pro Glu Val Pro Gln Leu Thr Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile  
 1265 1270 1275

Thr Asp Ser Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser  
 1280 1285 1290

Thr Ile Ile Gly Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly  
 1295 1300 1305

Ile Pro Ile Phe Glu Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr  
 1310 1315 1320

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

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

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

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

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

ES 2 606 906 T3

1385		1390		1395
Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala				
1400		1405		1410
Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser				
1415		1420		1425
Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly				
1430		1435		1440
Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser				
1445		1450		1455
Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg				
1460		1465		1470
Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe				
1475		1480		1485
Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser				
1490		1495		1500
Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser				
1505		1510		1515
Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly				
1520		1525		1530
Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val				
1535		1540		1545
Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala				
1550		1555		1560
Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly				
1565		1570		1575
Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr				
1580		1585		1590
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr				
1595		1600		1605
Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys				
1610		1615		1620

ES 2 606 906 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 606 906 T3

Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys  
 1865 1870 1875  
  
 Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg  
 1880 1885 1890  
  
 Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro  
 1895 1900 1905  
  
 Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile  
 1910 1915 1920  
  
 Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp  
 1925 1930 1935  
  
 Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys  
 1940 1945 1950  
  
 Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr  
 1955 1960 1965  
  
 Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser  
 1970 1975 1980  
  
 Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser  
 1985 1990 1995  
  
 Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser  
 2000 2005 2010  
  
 Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr  
 2015 2020 2025  
  
 Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg  
 2030 2035 2040  
  
 Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr  
 2045 2050 2055  
  
 Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser  
 2060 2065 2070  
  
 Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu  
 2075 2080 2085  
  
 Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp  
 2090 2095 2100

ES 2 606 906 T3

Val Pro Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Val Thr His Pro Gly  
 2105 2110 2115

Tyr Asp Thr Gly Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gln  
 2120 2125 2130

Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His Gly Phe  
 2135 2140 2145

Arg Arg Thr Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Pro Ile Arg His Arg  
 2150 2155 2160

Pro Arg Pro Tyr Pro Pro Asn Val Gly Glu Glu Ile Gln Ile Gly  
 2165 2170 2175

His Ile Pro Arg Glu Asp Val Asp Tyr His Leu Tyr Pro His Gly  
 2180 2185 2190

Pro Gly Leu Asn Pro Asn Ala Ser Thr Gly Gln Glu Ala Leu Ser  
 2195 2200 2205

Gln Thr Thr Ile Ser Trp Ala Pro Phe Gln Asp Thr Ser Glu Tyr  
 2210 2215 2220

Ile Ile Ser Cys His Pro Val Gly Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gln  
 2225 2230 2235

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

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

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

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

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

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

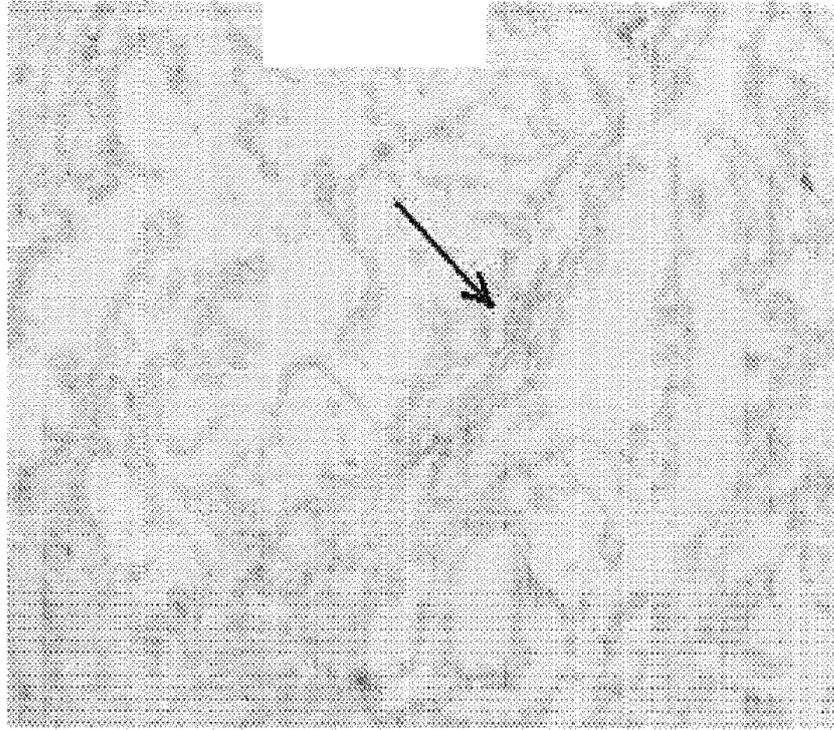
Phe Gly Ser Gly His Phe Arg Cys Asp Ser Ser Arg Trp Cys His



**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une de manera específica a la endosialina, siendo dicho anticuerpo producido por células que tienen el N.º de acceso ATCC PTA-9017, o un fragmento de unión al antígeno que se une de manera específica a la endosialina.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, el cual comprende un marcador detectable.
3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, en el que dicho marcador detectable comprende un marcador fluorescente, un radiomarcador o biotina.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, conjugado con una citotoxina.
- 10 5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 4, en el que dicha citotoxina comprende una toxina bacteriana, una toxina vírica o un radioisótopo.
6. Una célula recombinante que expresa un anticuerpo que se une de manera específica a la endosialina, y dicho anticuerpo es producido por células que tienen el N.º de acceso ATCC PTA-9017, o un fragmento de unión al antígeno que se une de manera específica a la endosialina.
- 15 7. Un polinucleótido aislado que codifica la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1.
8. Una composición para administración a un sujeto, y dicha composición comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 9. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en medicina, incluidas la terapia y el diagnóstico.
10. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno conforme a las reivindicaciones 1, 4 o 5, para uso en el tratamiento del cáncer.
- 25 11. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para uso conforme a la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la interacción de la endosialina expresada en la superficie de una célula y con colágeno o fibronectina.
12. El uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de las reivindicaciones 1, 4 o 5, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la interacción de endosialina expresada en la superficie de una célula con colágeno o fibronectina, para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

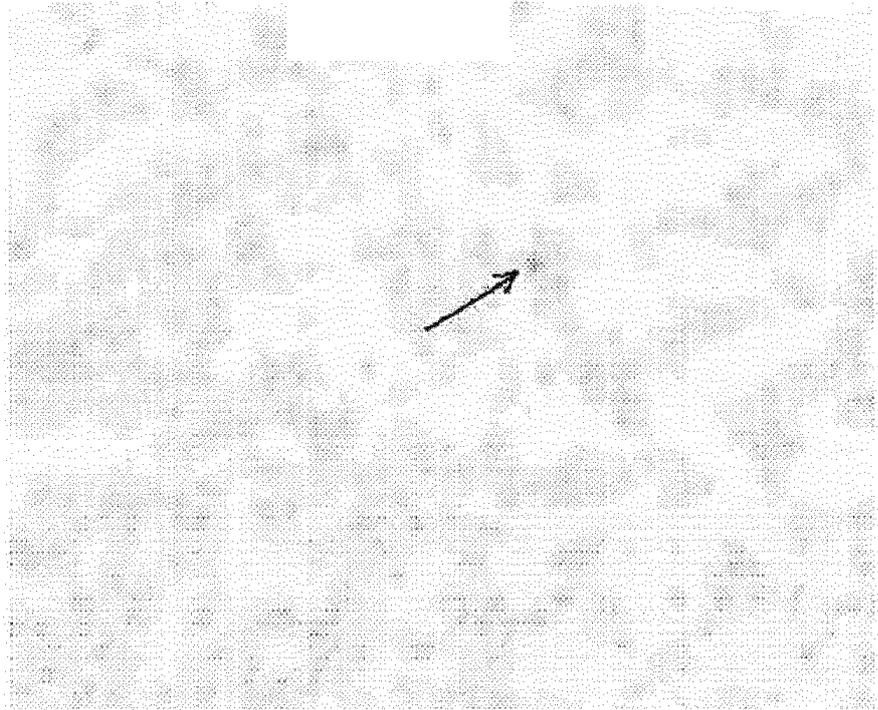
30



*FIG. 1A*



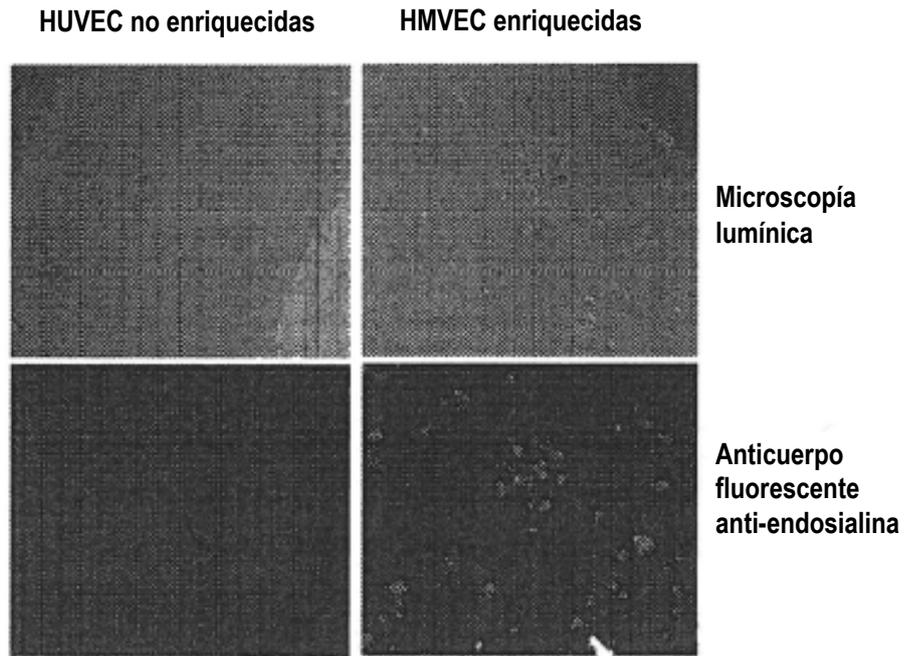
*FIG. 1B*



*FIG. 2A*



*FIG. 2B*



*FIG. 3*

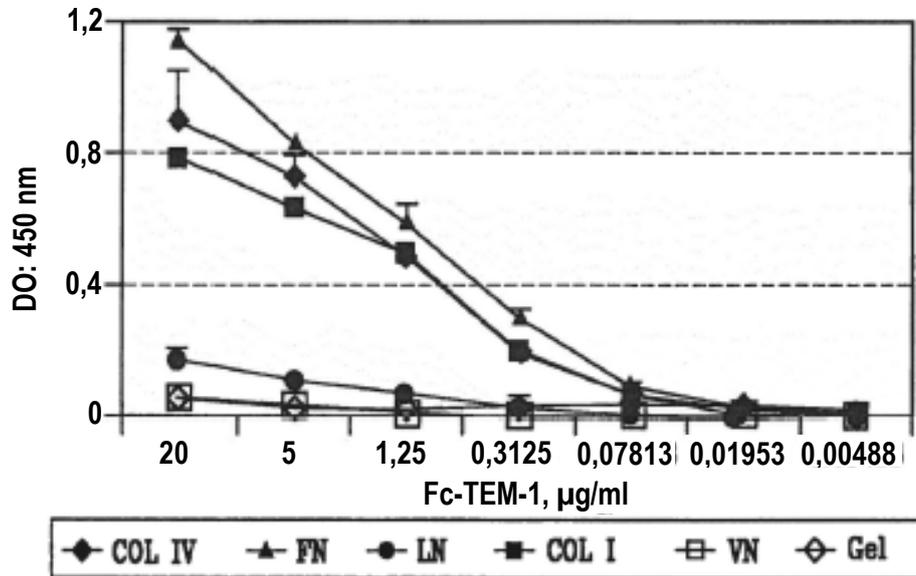


FIG. 4A

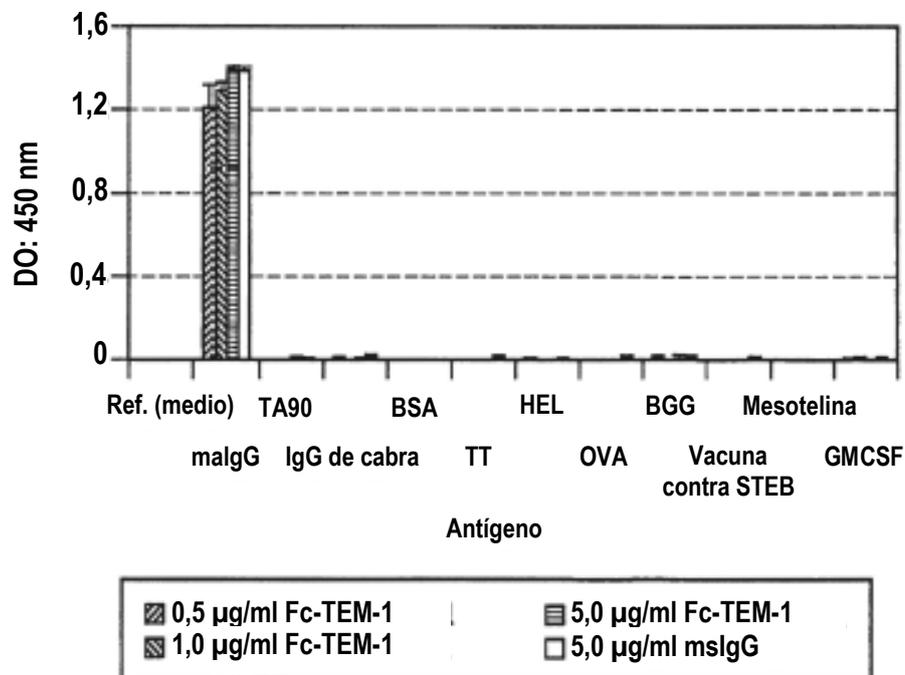
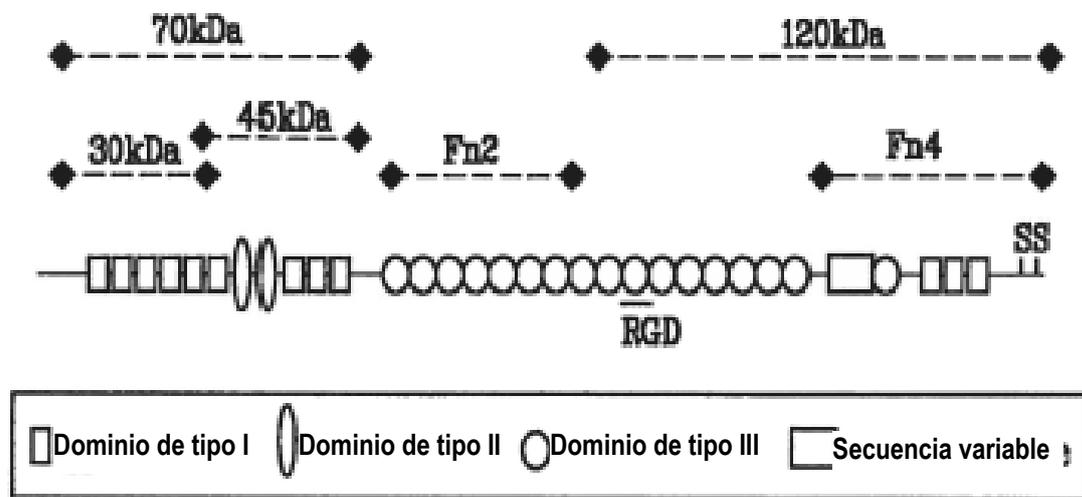
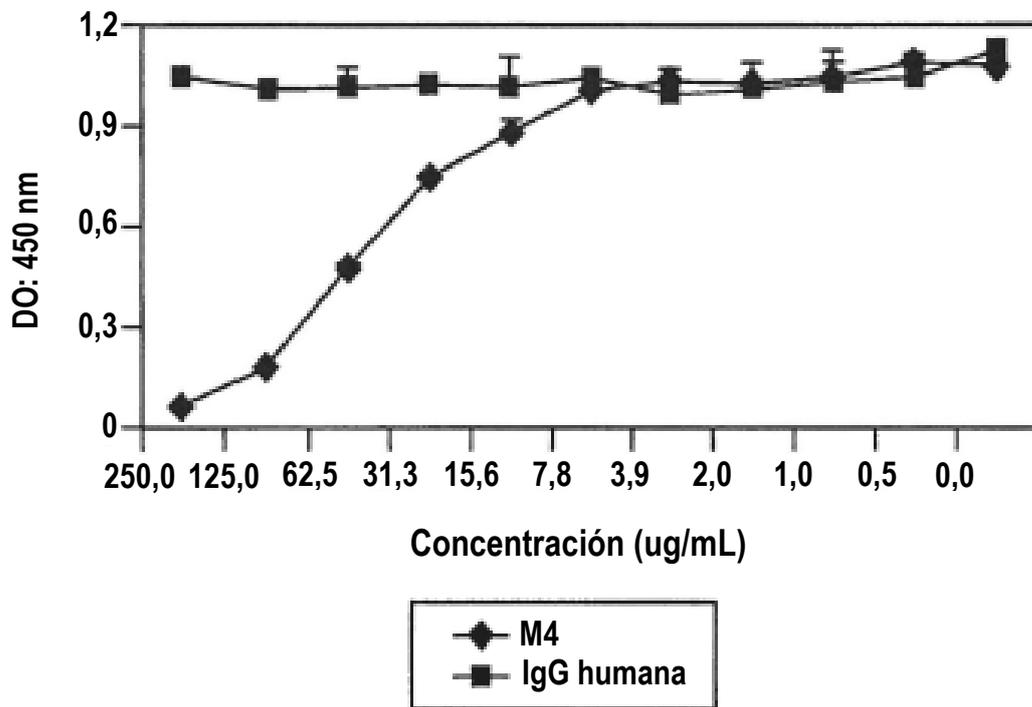


FIG. 4B



*FIG. 5*



*FIG. 6*

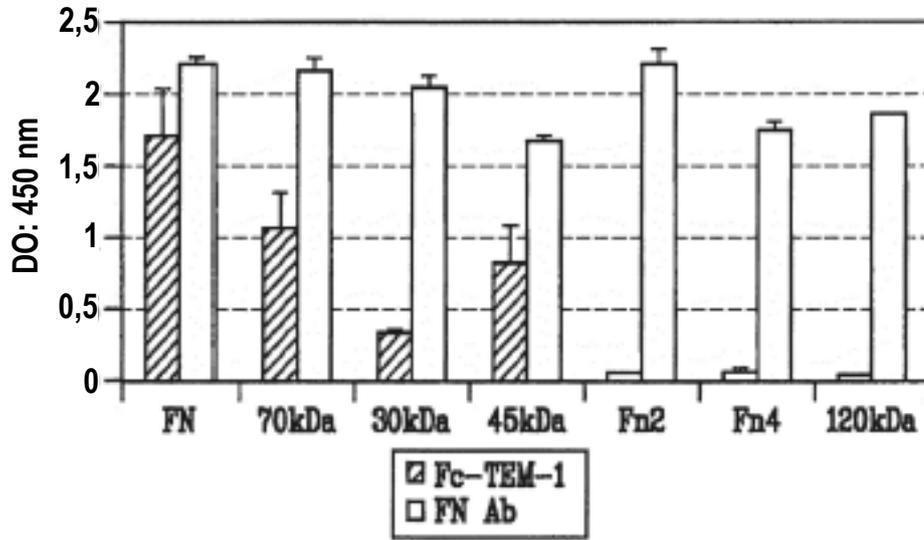


FIG. 7A

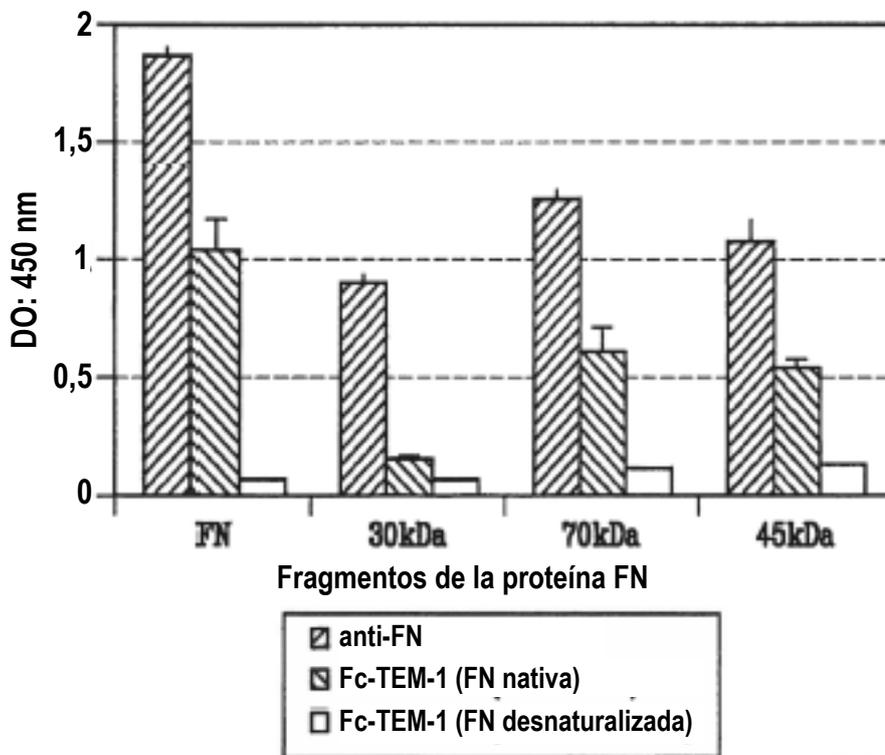


FIG. 7B

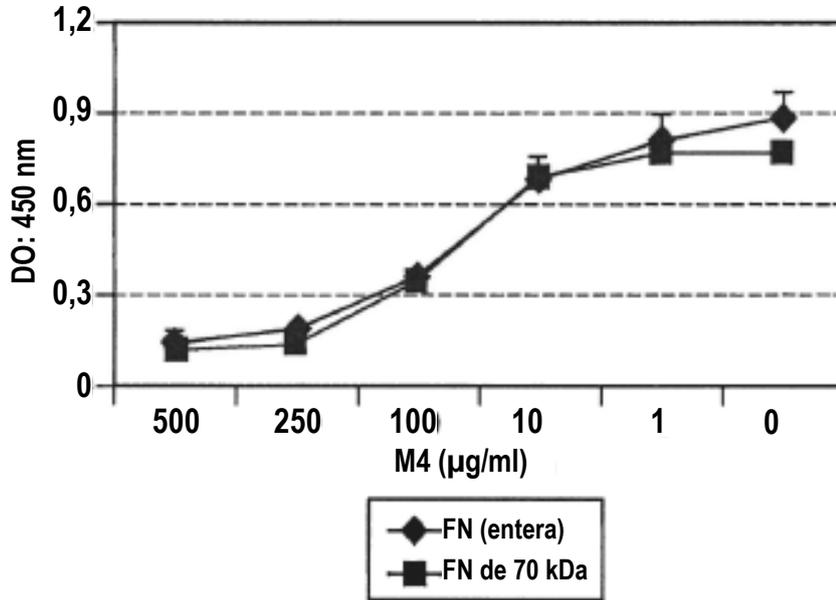


FIG. 7C

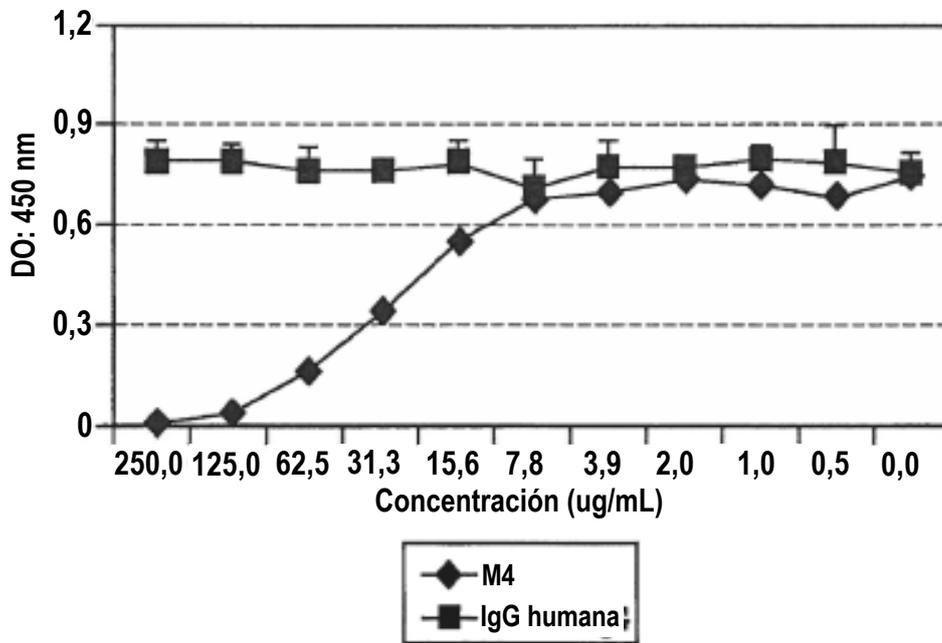
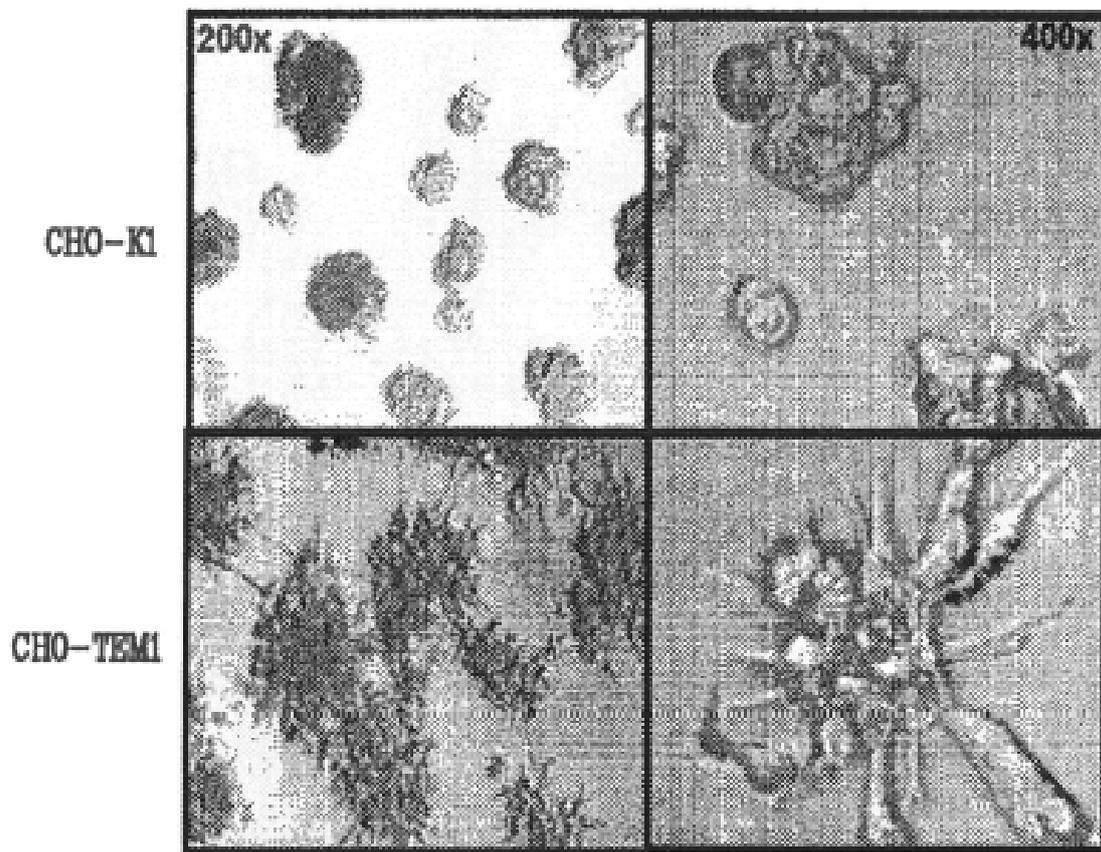
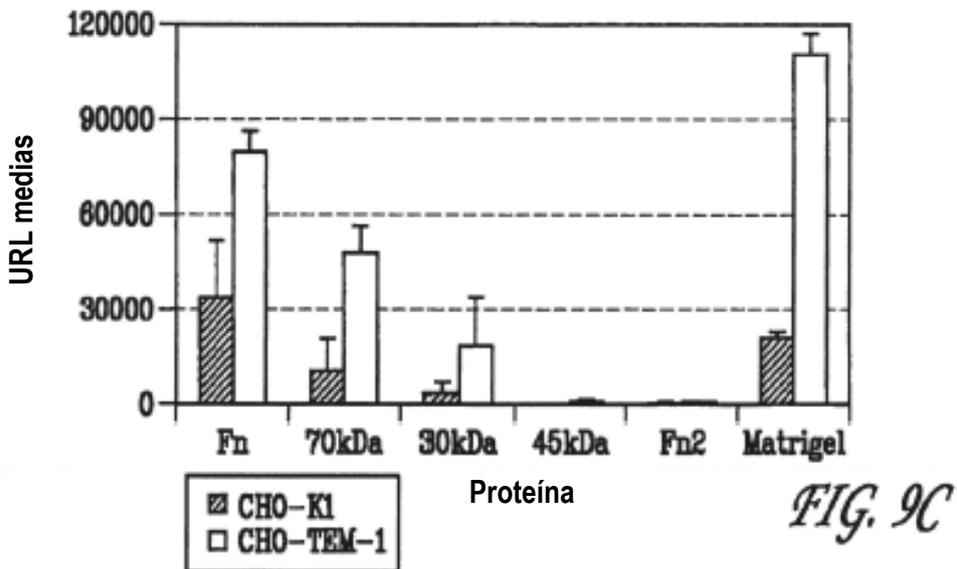
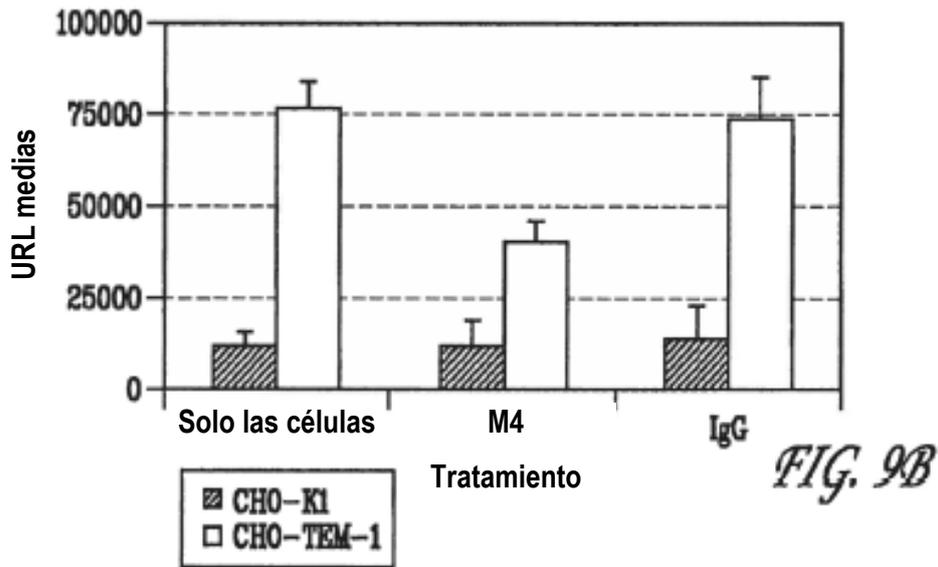
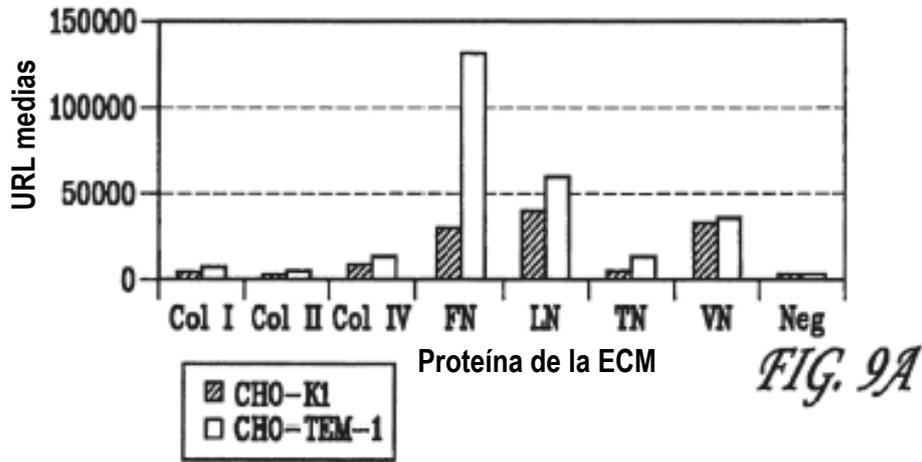


FIG. 7D

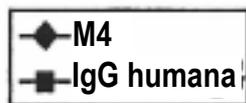
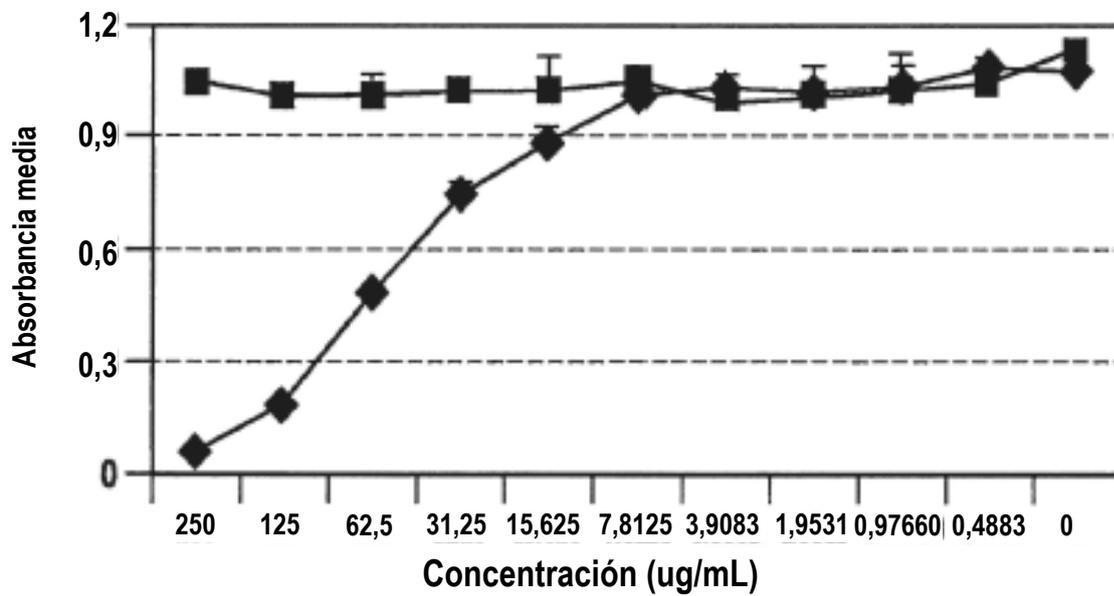


*FIG. 8*



La endosialina se une al colágeno I y el M4 inhibe dicha unión

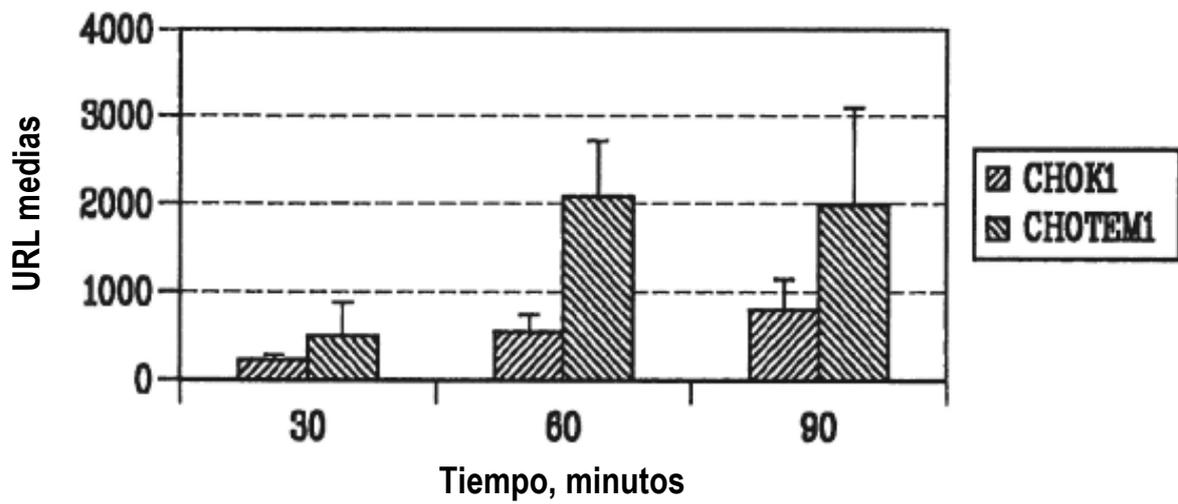
Inhibición, por el M4, de la unión de la Fc-TEM-1 al COL I



*FIG. 10*

La endosialina aumenta la adhesión celular al colágeno

Adhesión de las células CHOK1 y CHOTEM1 a la placa revestida de COL I



*FIG. 11*

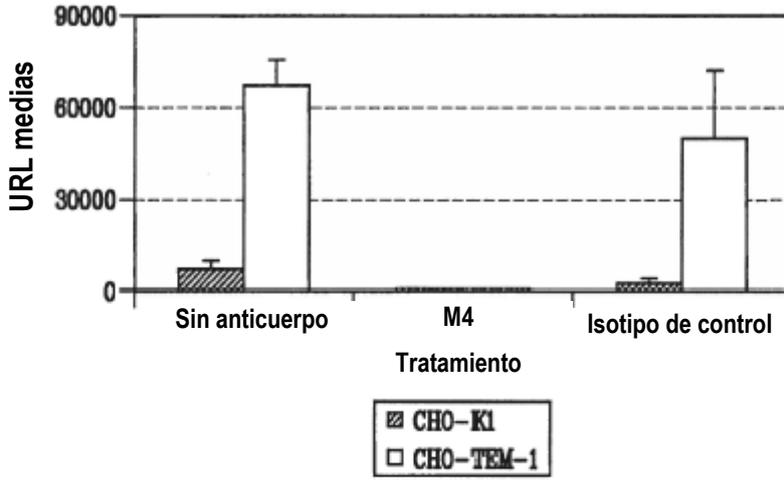


FIG. 12A

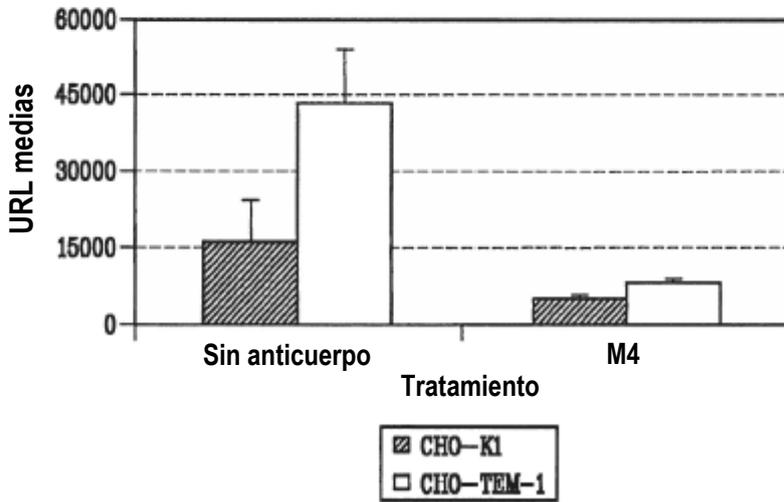
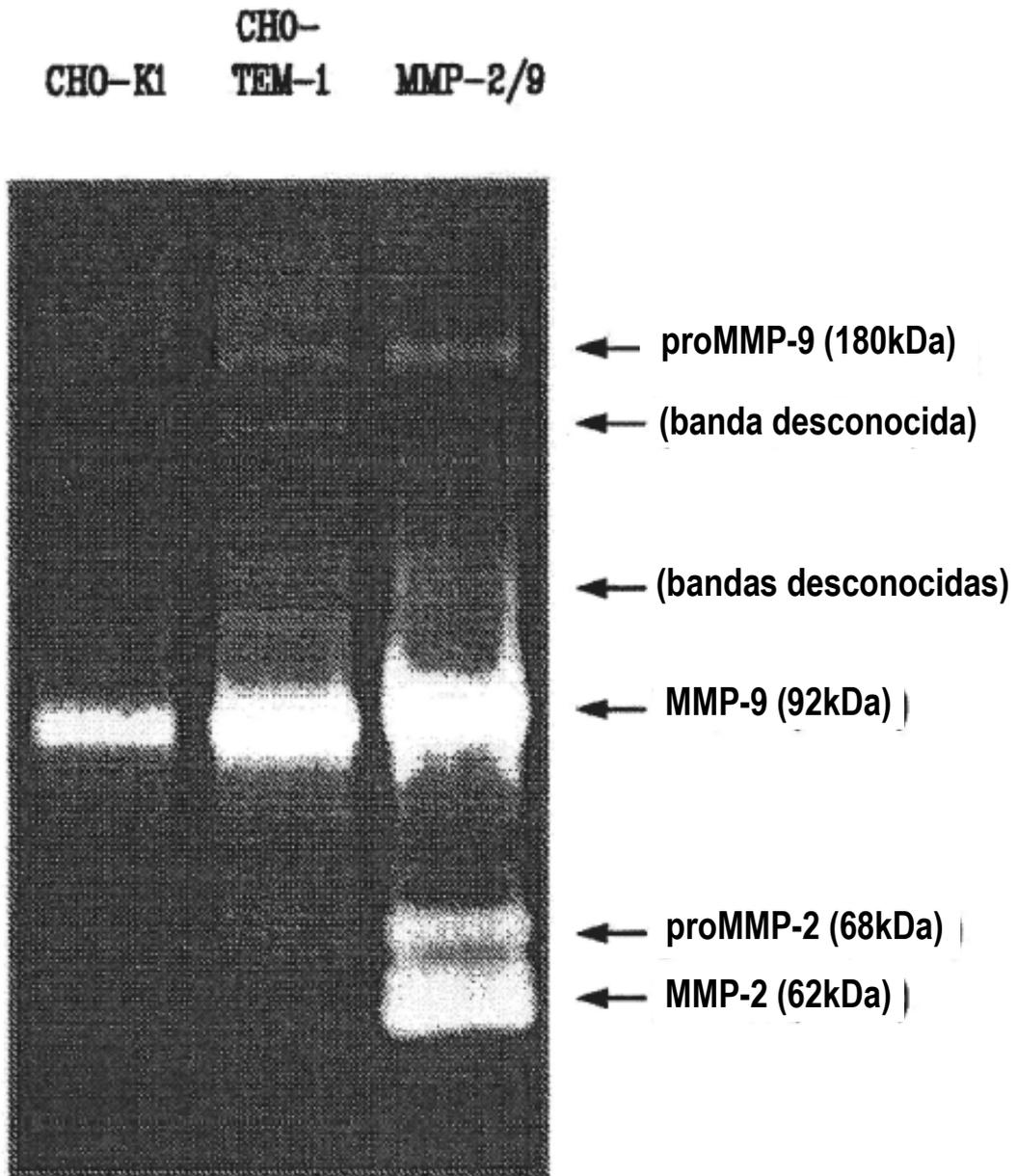
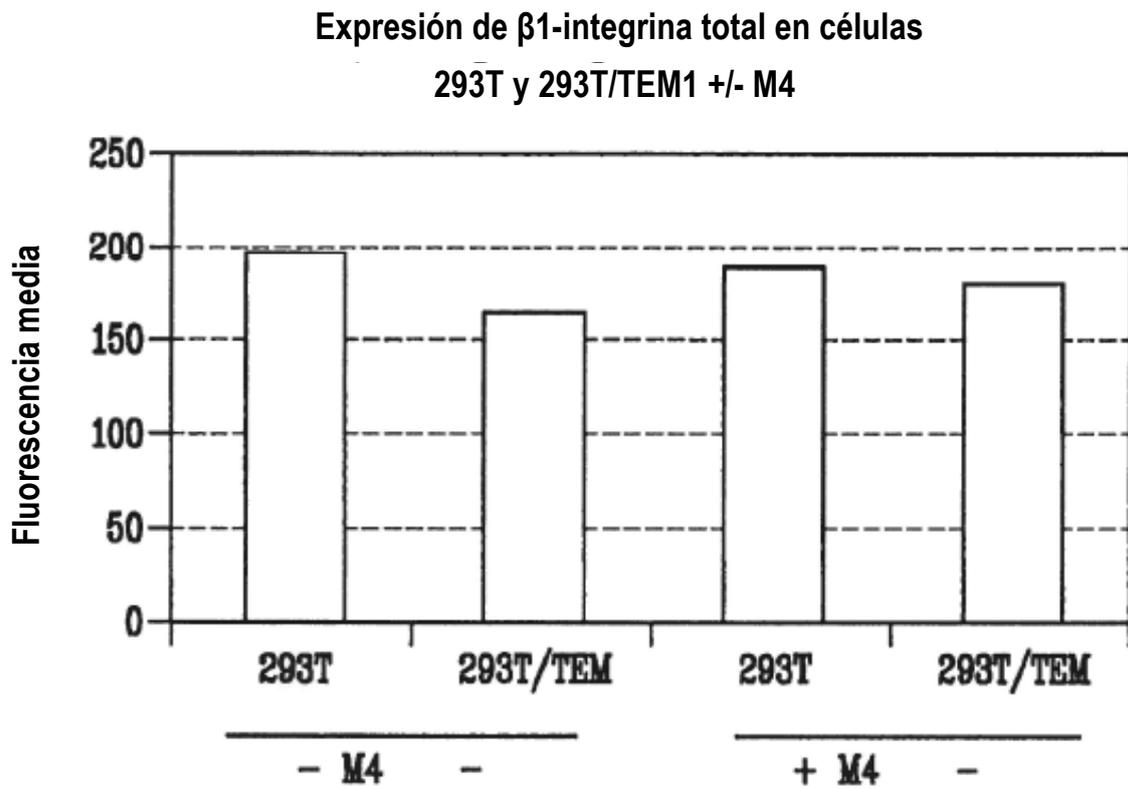


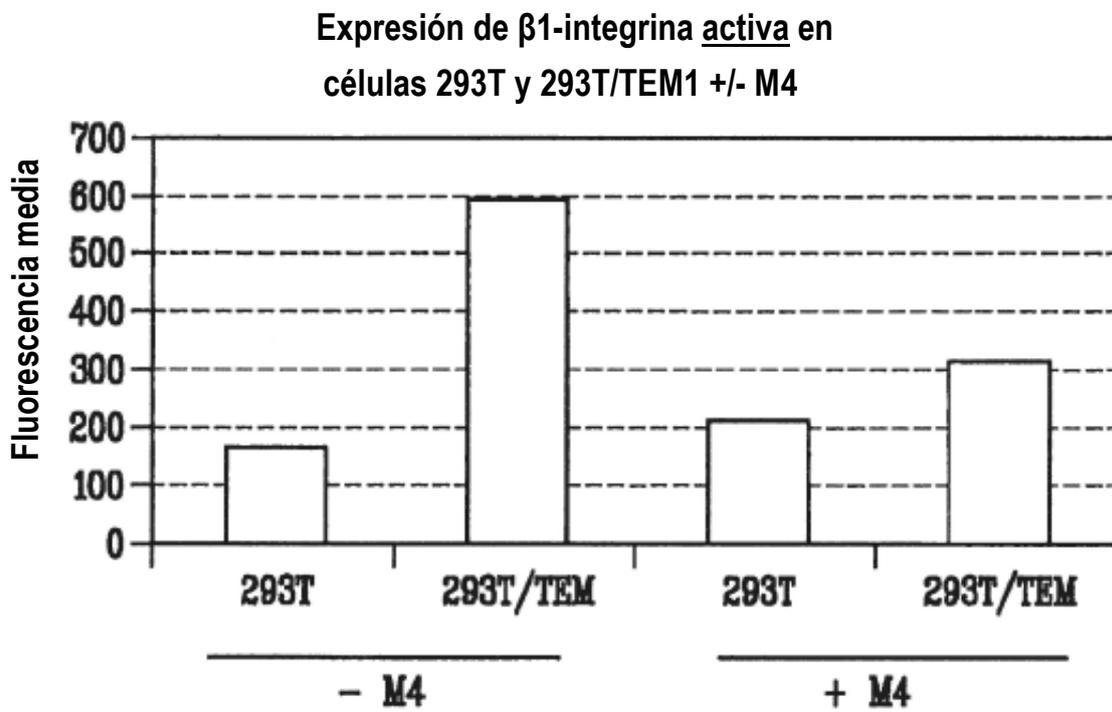
FIG. 12B



*FIG. 13*



*FIG. 14A*

*FIG. 14B*

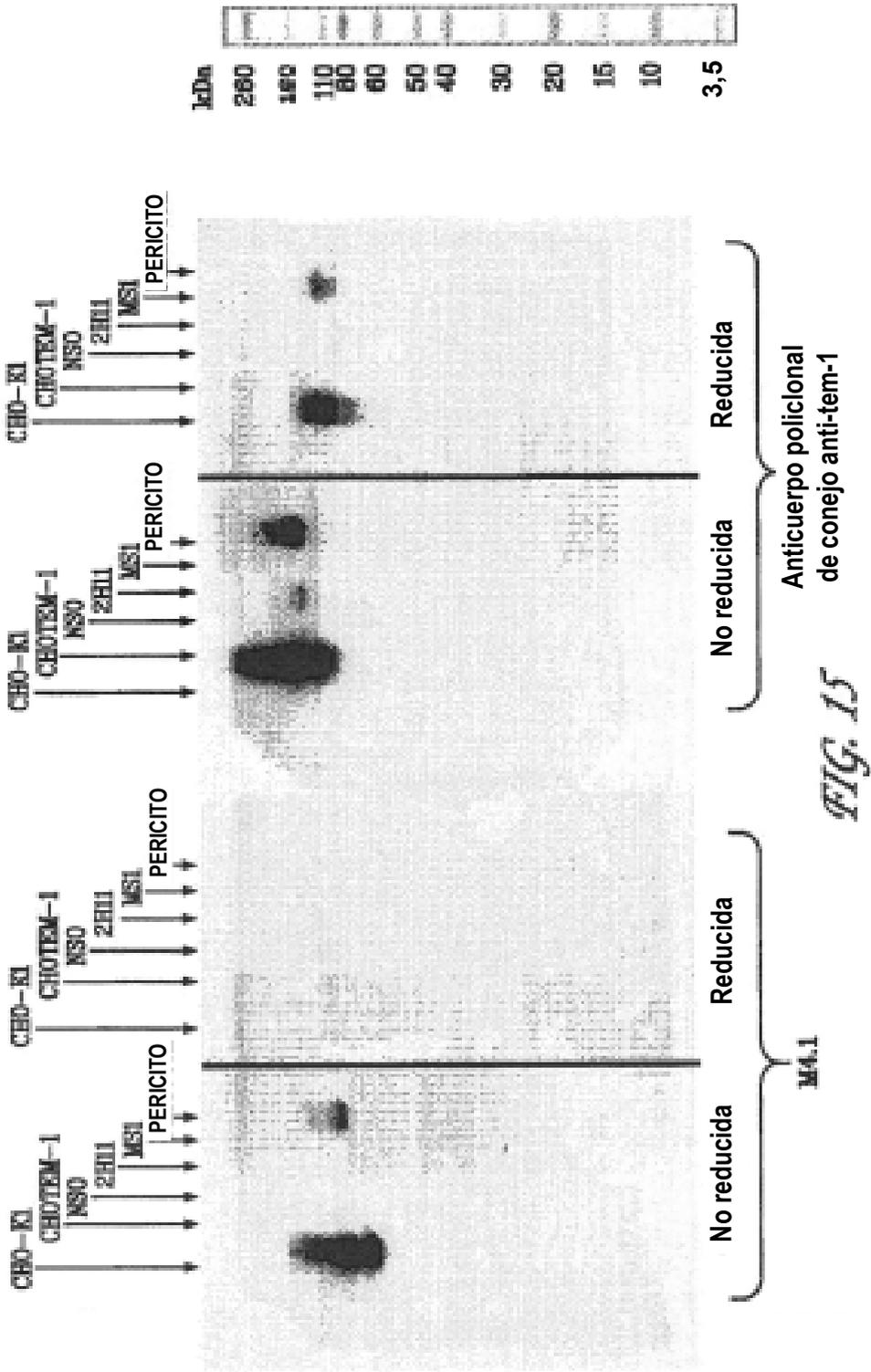


FIG. 15