

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 102**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2009 PCT/US2009/000162**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009 WO09089062**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2009 E 09700394 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2242769**

54 Título: **Anticuerpos con dominio EC1 dirigidos contra cadherina-11 para tratar trastornos inflamatorios articulares**

30 Prioridad:

11.01.2008 US 10734 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2017

73 Titular/es:

**ADHERON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
200 Boston Avenue, Suite 1100
Medford, MA 02155, US**

72 Inventor/es:

MCARTHUR, JAMES, G.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 611 102 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

Anticuerpos con dominio EC1 dirigidos contra cadherina-11 para tratar trastornos inflamatorios articulares

5 **Antecedentes de la invención**

Los pacientes con inflamación articular crónica avanzada padecen un deterioro grave de la articulación que incluye la destrucción del hueso y del cartilago, dando como resultado dolor a largo plazo, deformidad, pérdida de la función articular, reducción de la movilidad y acortamiento de la esperanza de vida. La inflamación articular está asociada con un aumento en el número de células y sustancias inflamatorias en la articulación, que producen irritación, desgaste del cartilago e inflamación del revestimiento articular. Se sabe que varios trastornos autoinmunitarios diferentes desencadenan una inflamación adecuada o mal dirigida de la articulación, dando como resultado la inflamación crónica de las articulaciones de las personas que padecen estos trastornos. Los trastornos inflamatorios articulares comunes incluyen artritis reumatoide, artritis psoriática, síndrome de Reiter y espondilitis anquilosante.

La artritis reumatoide (AR) es la forma más común de artritis inflamatoria y se estima que afecta a aproximadamente el 1 por ciento de la población de EE.UU., o aproximadamente 2,1 millones de estadounidenses. La AR es una enfermedad crónica que se caracteriza por la inflamación del revestimiento, o sinovio, de las articulaciones, y puede llevar a un daño significativo del hueso y el cartilago con el tiempo. La AR es más habitual en mujeres que en hombres y, hasta un 3 % de las mujeres pueden desarrollar artritis reumatoide en algún momento de su vida. Actualmente, se desconoce la causa de la AR.

La AR puede llevar a largo plazo al daño articular, dando como resultado dolor crónico, pérdida funcional e incapacidad. Además, investigaciones recientes indican que las personas con artritis reumatoide, especialmente aquellas cuya enfermedad no está bien controlada, pueden tener un mayor riesgo de enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular. Por lo tanto, AR es una importante carga para la salud nacional y existe necesidad urgente de desarrollar nuevos agentes para la prevención y el tratamiento de la artritis reumatoide, y otros trastornos inflamatorios articulares.

El documento WO 99/57149 divulga compuestos y métodos para modular funciones no clásicas mediadas por cadherina, Patel et al (Cell, 124, 1255-1268, 2006) describe estructuras del ectodominio de tipo II de la cadherina. La Prueba 1 describe conclusiones relativas a los dominios extracelulares (ECD, extracellular domains) en la interacción de unión a cadherina.

35 **Sumario de la invención**

La materia sujeto de la invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

40 **Breve descripción de los dibujos**

El archivo de patente o de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos en color si se solicita, tras el pago de los honorarios necesarios.

La Fig. 1A es una transferencia Western que muestra la detección de una proteína de fusión Cadherina-11-EC1-5-Fc que usa anticuerpos 23C6 dirigidos contra Cad-11, 13C2 y 27F3 (véanse las flechas sólidas). Estos anticuerpos no reconocen las proteínas de fusión Cadherina-11-EC1-Fc y Cadherina-11-EC1/2-Fc que también están presentes en la membrana (véanse las flechas abiertas para las posiciones de las proteínas Cadherina-11-EC1-Fc y Cadherina-11-EC1/2-Fc en la transferencia).

La Fig. 1B es un gráfico que muestra la unión de los anticuerpos 13C2, 23C6 y 5F82 de Cadherina-11 públicos dirigidos contra la proteína de fusión Cad-11- EC1-5-Fc humana, pero no contra la proteína de fusión Cad-11-EC1-Fc, determinado mediante ELISA. Por el contrario, el anticuerpo H1M1 de EC1 se une tanto a la proteína de fusión Cad-11-EC1-Fc como a la proteína de fusión Cad-11-EC1-5-Fc.

La Fig. 2 es un alineamiento de secuencia de aminoácidos de los 34 primeros aminoácidos de los dominios EC1 de la Cad-11 humana (SEQ ID NO:3), MN-Cad (SEQ ID NO:4), y Cad-8 (SEQ ID NO:5) que están involucrados en el de unión a cadherina. Las secuencias donantes que contienen restos que se extienden al bolsillo de un contrarreceptor de cadherina están indicados por el subrayado de la mitad izquierda de la secuencia, y los restos de la secuencia del bolsillo se indican por el subrayado de la mitad derecha de secuencia en la SEQ ID NO:3.

La Fig. 3 es un gráfico que representa la unión de Fab de unión a Cadherina-11 con un péptido del dominio EC1 de Cad-11 humano, así como la proteína de fusión Cad-11-EC1-Fc, pero no los péptidos del dominio EC1 de Cad-8 o MN-Cad, determinado mediante ELISA. El Clon 7 demostró una unión significativa al péptido del dominio EC1 de Cad-11 y a la proteína de fusión, pero no los péptidos del dominio EC1 de MN-Cad o Cad-8.

La Fig. 4 es un gráfico que representa datos de un ensayo de agregación de células Cad-11 *in vitro*. Los antagonistas de Cad-11 agregados al medio, tal como un Fab fabricado a partir del anticuerpo 13C2 dirigido contra Cad-11, o cantidades variables de un Fab EC1 anti-cadherina-11 dirigido contra los 35 primeros aminoácidos del dominio EC1 de Cadherina-11 (designado clon 7 de Fab de EC1), bloquean la agregación de células 431-D-11

mediada por Cad-11. El Fab de EC1 anti-Cadherina-11 (clon 7) inhibió la agregación de células de carcinoma epidermoide A-431-D-11 en todas las concentraciones ensayadas en un intervalo de 0,3 µg/ml a 10 µg/ml. Por el contrario, el Fab fabricado a partir del anticuerpo 13C2 anti-Cadherina-11 solamente inhibió la agregación celular a una concentración de 10 µg/ml. La Fig. 5 es un gráfico que representa datos de un segundo ensayo de agregación de células Cad-11 *in vitro*. Se muestra el porcentaje de agregación de las células 431-D-11 a los 40 min. tras la adición bien de medio SME (control designado), concentraciones variables de una proteína de fusión que comprende el dominio EC1 de Cad-11 fusionado con la bisagra de la IgG2 humana, los dominios CH2 y CH3 (designado Cad-11-EC1-Fc), concentraciones variables de un Fab de EC1 anti-Cadherina-11 dirigido contra los 35 primeros aminoácidos del dominio EC1 de Cadherina-11 (designado Cad-11 EC1 Fab) o concentraciones variables de un Fab de control dirigido contra la proteína fluorescente verde (anti-GFP) (designado GFP fAb). El Fab de EC1 anti-Cadherina-11 (clon 7) inhibió la agregación de células 431-D-11 que expresan Cad-11 a concentraciones de 3 µg/ml, 1 µg/ml y 0.1 µg/ml. La proteína de fusión EC1- Fc inhibió la agregación de células 431-D-11 a concentraciones de 3 µg/ml. Por el contrario, el Fab anti-GFP no pudo inhibir la agregación celular de forma significativa en ninguna de las concentraciones de ensayo.

La Fig. 6 es un gráfico que representa la inhibición de la agregación celular mediada por Cad-11 mediante diferentes Fab dirigidos contra EC1 de Cadherina-11 que tienen especificidad de unión para Cad-11 solo (clon 7 y clon 4 de Fab de EC1), Cad-11 y Cad-8 (clon 6 de Fab de EC1), o Cad-11 y MN-Cad (clon 5 de Fab de EC1), usando un ensayo de agregación celular *in vitro*. Todos los Fab probados inhibieron la agregación de células 431-D-11 con respecto al control (D-11 SME; barra izquierda).

La Fig. 7 es un gráfico que representa la inhibición de la agregación celular mediada por Cad-11 con Fab dirigidos contra Cad-11 que tienen especificidad de unión para Cad-11 solo (clon 7 de Fab de EC1), o Cad-11 y MN-Cad (clon 8 de Fab de EC1), usando un ensayo de agregación celular *in vitro*. La especificidad de los Fab probados se muestra entre paréntesis al lado al lado de cada designación Fab. Ambos Fab específicos de cadherina inhibieron la agregación celular (barras central y derecha) con respecto a un Fab de control específico de GFP (barra izquierda).

La Fig. 8 muestra la secuencia de nucleótidos (ADN) (SEQ ID NO:6) de la proteína de fusión Cad-11-EC1-hlgG2-Fc1 humana (Cad-11-EC1-Fc). La secuencia del dominio extracelular de la Cadherina-11 humana se muestra en cursiva, el sitio BgIII está subrayado, y la secuencia que codifica la región IgG2-Fd humana se muestra en letra negrita.

La Fig. 9 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:7) de la proteína de fusión Cad-11-EC1-hlgG2-Fc1 humana (Cad-11-EC1-Fc). La secuencia del dominio extracelular de la Cadherina-11 humana se muestra en cursiva, la secuencia que codifica el sitio BgIII está subrayada, y la secuencia de la región IgG2-Fd humana se muestra en letra negrita.

La Fig. 10 es una imagen de un gel de poliacrilamida SDS que se ha teñido con azul de Coomassie, que muestra las bandas intensas predominantes correspondientes a la forma monomérica de las proteínas de fusión Cad-11-EC1-hlgG2-Fc (hileras intermedia) y Cad-11-EC1/2-hlgG2-Fc1 (hileras derecha), respectivamente, tras la purificación a partir del medio de cultivo celular usando una columna de proteína A. Los patrones de peso molecular se muestran en la hilera de la izquierda.

La Fig. 11 es una transferencia Western que muestra la detección de las proteínas de fusión Cad-11-EC1-hlgG2-Fc1 (hileras intermedia) and Cad-11-EC1/2- hlgG2-Fc1 (hileras derecha) humanas usando un anticuerpo dirigido contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La banda predominante observada en cada hilera corresponde a las ubicaciones de las formas monoméricas de las proteínas de fusión. Las ubicaciones de las formas dimericas de las proteínas de fusión también son visibles (véanse las bandas de peso molecular más alto menos intensas), debido a las condiciones de reducción incompleta. Los patrones de peso molecular se muestran en la hilera de la izquierda.

La Fig. 12 es un gráfico que representa que la proteína de fusión Cad-11-EC1-Fc y un anticuerpo dirigido contra Cad-11 de ratón, 13C2, inhiben la invasión de sinoviocitos análogos a fibroblastos humanos que expresan Cad-11 en un lecho de matrigel en las concentraciones indicadas, en comparación con las células sin tratar, marcado *Invasion*. Se han combinado los datos de dos experimentos independientes.

Las FIGS. 13A y B son gráficos que representan datos de dos ensayos de agregación de células Cad-11 *in vitro*. Se muestra el porcentaje de agregación de las células 431-D-11 que expresan Cad-11 a los 40 min. tras la adición bien de medio SME (control designado) o una proteína de fusión Cad-11. La Fig. 13A muestra la inhibición de la agregación en presencia de concentraciones variables de una proteína de fusión que comprende los 5 dominios extracelulares de Cad-11 fusionados con la bisagra de la IgG2 humana, dominios CH2 y CH3 (designado Cad-11-EC1-5-Fc). La Fig. 13B muestra la inhibición de la agregación de concentraciones variables de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular del extremo N (dominio EC1) de Cad-11 fusionado con la bisagra de la IgG2 humana, dominios CH2 y CH3 (designados Cad-11-EC 1-Fc) o Cad-11-EC1-5-Fc.

Las FIGS. 14A-C muestran la secuencia del ADNc de la cadherina-11 (SEQ ID NO:1; véase el número de registro de GenBank NM001797).

La Fig. 15 muestra la secuencia de proteínas de la cadherina-11 (SEQ ID NO:2; véase el número de registro de GenBank NP001788).

La Fig. 16 es un gráfico que representa el nivel de unión de los anticuerpos al medio procedente de hibridomas del péptido 4 (HL), o medio de hibridoma de control (Media), a proteínas que contienen los dominios EC1-2 de Cad-11, Cad-8 o MN-Cad, determinado mediante ELISA.

Las FIGS. 17A-C son gráficas representativas que representan la intensidad de tinción celular (MFI; intensidad de fluorescencia promedio) como medida de la unión del anticuerpo H14 a las células 431-D-11 que expresan Cad-11.

Las FIGS. 17D-F son gráficas representativas que representan la ausencia de tinción celular 431-D (MFI; intensidad de fluorescencia promedio) con respecto a las FIGS. 17A-C, que indican una falta de unión del anticuerpo H14 a las células negativas para Cad-11.

Las FIGS. 17G-I son gráficas representativas que representan la intensidad de tinción celular (MFI; intensidad de fluorescencia promedio) como medida de la unión del anticuerpo H1M1 a las células 431-D-11 que expresan Cad-11.

La Fig. 18A es un gráfico que representa la unión del anticuerpo H14 a células que expresan Cad-11, y la ausencia de la unión de H14 a células de control negativas para Cad-11, a concentraciones variables del anticuerpo, medido según la intensidad de tinción celular (MFI; intensidad de fluorescencia promedio).

La Fig. 18B es un gráfico que representa la unión del anticuerpo H1M1 a células que expresan Cad-11, y la ausencia de unión de H1M1 a células de control negativas para Cad-11, a concentraciones variables del anticuerpo, medido según la intensidad de tinción celular (MFI; intensidad de fluorescencia promedio).

La Fig. 19A es un gráfico que representa el grado de unión del anticuerpo H14 anti-Cad-11 a los péptidos del dominio EC1 de Cad-11 y Cad-8 a diversas concentraciones del anticuerpo, determinado mediante ELISA.

La Fig. 19B es un gráfico que representa la ausencia de unión del anticuerpo H14 anti-Cad-11 a los péptidos del dominio EC1 de Cad7, MNCad, Cad9, Cad18, Cad20 o Cad24 a diversas concentraciones del anticuerpo, determinado mediante ELISA.

La Fig. 20 es un gráfico que representa la unión del anticuerpo H1M1 anti-Cad-11 a los péptidos del dominio EC1 de Cad-11 y Cad-8 a concentraciones variables del anticuerpo, determinado mediante ELISA.

La Fig. 21A es un gráfico que representa el grado de unión del anticuerpo H1M1 anti-Cad-11 a diferentes inmunógenos peptídicos del dominio EC1 de Cad-11 (PEP1, PEP2, PEP3 y PEP4), así como la proteína de fusión del dominio EC1 de Cad-11 (EFL) y la IgG humana de control (Fc bloqueado), determinado mediante ELISA.

La Fig. 21B es un gráfico que representa el grado de unión del anticuerpo H14 anti-Cad-11 a diferentes inmunógenos peptídicos del dominio EC1 de Cad-11 (PEP1, PEP2, PEP3 y PEP4), así como la proteína de fusión del dominio EC1 de Cad-11 (EFL) y la IgG humana de control (Fc bloqueado), determinado mediante ELISA.

La Fig. 22 es un diagrama esquemático que representa la secuencia de los primeros 37 aminoácidos del dominio EC1 de la cadherina-11 humana y las partes de esta secuencia abarcadas por cada uno de los péptidos 1-4. Los restos de aminoácidos compartidos por los péptidos 2 y 4 que están antes del péptido 3 están destacados en la región recuadrada. Los aminoácidos directamente implicados en la unión de Cad-11 a Cad-11 están subrayados.

La Fig. 23A es una fotografía que muestra una gran masa de células que expresan Cad-11 agregadas que se trataron con un anticuerpo control de isotipo.

La Fig. 23B es una fotografía que muestra pequeños agregados de células que expresan Cad-11 tratadas con H1M1 que no avanzaron para formar las grandes masas observadas en la FIG. 23A.

La Fig. 23C es una fotografía que muestra que las células precursoras negativas para Cad-11 permanecen como grupos de una o dos células.

La Fig. 24A que representa un cultivo de células que expresan Cad-11 con grandes masas de células agregadas.

La Fig. 24B es una fotografía que representa un cultivo de células que expresan Cad-11 con predominantemente células individuales con pequeños e infrecuentes agregados celulares, con respecto a la FIG. 24A después del tratamiento con el anticuerpo H14 del dominio EC1 de Cad-11.

La Fig. 25 es un gráfico que representa la inhibición de la inflamación articular asociada a artritis en ratones tratados con dosis crecientes de anticuerpo H1M1 dirigido contra Cad-11 con respecto a ratones control no tratados.

La Fig. 26 es un gráfico que representa la inhibición de la inflamación articular asociada a artritis en ratones tratados con 0,3 mg de anticuerpos H14 o H1M1 dirigidos contra Cad-11 en días alternos, con respecto a ratones control no tratados.

La Fig. 27 es un gráfico que muestra que el tratamiento con 0,3 mg de anticuerpos H14 o H1M1 retrasa la aparición de artritis en un modelo de artritis en ratón, en comparación con un control no tratado.

La Fig. 28 es un gráfico que representa el grado de unión de medio que contiene anticuerpos procedentes de hibridomas del péptido 3 (HL), o medio de hibridoma de control (Media), a los dominios EC1-2 de Cad-11, Cad-8, y MN-cadherina, o una proteína de fusión EC1-Fc de Cad-11.

La Fig. 29 es un gráfico que representa el grado de unión de anticuerpos dirigidos contra Cad-11 procedentes de hibridomas del péptido 3 a células que expresan la proteína Cad-11 humana (véase la flecha) y células de control que no expresan Cad-11 que expresan Neos.

55 Descripción detallada de la invención

Las reivindicaciones definen la materia para la que se solicita la protección, cualquier declaración que vaya más allá de lo que se define en las reivindicaciones se proporciona meramente como información.

60 Definiciones

Como se usa en el presente documento, los términos "cadherina-11," "Cad-11," y "OB-Cadherina" se refieren a una Cadherina de origen natural o cadherina-11 endógena (por ejemplo, una proteína de mamífero, por ejemplo, humana), y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que una proteína cadherina-11 endógena de origen natural (por ejemplo, proteínas recombinantes, proteínas sintéticas). De acuerdo con ello, los términos "cadherina-11", "Cad-11," y "OB-Cadherina", que se utilizan indistintamente en el presente documento, incluyen

variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas de una proteína cadherina-11 (por ejemplo, de mamíferos, humana) producida mediante, por ejemplo, corte y empalme alternativo u otros procesos celulares, que se producen de forma natural en mamíferos (por ejemplo, seres humanos, primates no humanos). Preferentemente, la proteína cadherina-11 es una proteína humana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 (véase, el número de registro de GenBank NP001788 y la FIG. 15).

Tal como se define en el presente documento, un "antagonista de la cadherina-11" es un anticuerpo que se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 e inhibe (por ejemplo, reduce, previene) una o más actividades mediadas por la cadherina-11 en una célula. Las actividades mediadas por la cadherina-11 incluyen, pero no se limitan a, la unión de una proteína cadherina-11 a una o más de las otras proteínas cadherina-11 de forma homotípica, agregación de células que expresan cadherina-11, inducción de la expresión o actividad de enzimas (por ejemplo, colagenasa, serina proteasas, MMP1, MMP3, MMP13), e inducción de citoquinas o factores de crecimiento (por ejemplo, IL-6, IL-8 o RANKL o TRANCE). El antagonista de la cadherina-11 puede inhibir la unión de una proteína cadherina-11 a una o más de las otras proteínas cadherina-11, mediante, por ejemplo, bloqueo de la interacción entre las secuencias donantes del dominio EC1 de una proteína Cad-11 (por ejemplo, una proteína Cad-11 expresada sobre la superficie de una célula) con una secuencia bolsillo en el dominio EC1 de una o más de las otras proteínas Cad-11 (por ejemplo, uno o más proteínas Cad-11 expresadas sobre la superficie de otra célula).

Como se usa en el presente documento, un antagonista de la cadherina-11 que "se une específicamente" un dominio EC1 de una proteína Cadherina-11 se refiere a un antagonista de la cadherina-11 que se une (por ejemplo, en condiciones fisiológicas) a un dominio EC1 de una proteína Cadherina-11 con una afinidad (por ejemplo, una afinidad de unión) que sea al menos 10 veces mayor que la afinidad con el que el antagonista de la Cadherina-11 se une a un dominio EC1 de otra proteína cadherina (por ejemplo, MN-Cadherina, cadherina-8). El antagonista de la cadherina-11 que se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 se une a un epítipo presente en la SEQ ID NO:3, la parte del extremo N del dominio EC1 de la cadherina-11 humana, con una afinidad que sea al menos 10 veces mayor que la afinidad con el que antagonista de la cadherina-11 se une a un epítipo presente en la SEQ ID NO:4, la parte del extremo N del dominio EC1 de la MN-Cadherina, y la afinidad con el que antagonista de la cadherina-11 se une a un epítipo presente en la SEQ ID NO:5, la parte del extremo N del dominio EC1 de la cadherina-8 humana.

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "anticuerpo" abarque tanto anticuerpos completos como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab'), y dAb). "Anticuerpo" se refiere a anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, e incluye anticuerpos naturales y genomanipulados. Por lo tanto, el término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos humanos, quiméricos, humanizados, primatizados, venerizados, monocatenarios y de dominio (dAbs). (Véase, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

El término "epítipo" se refiere a una unidad estructural convencionalmente unida mediante una pareja V_H/V_L de inmunoglobulina. Un epítipo define el sitio de unión mínimo de un anticuerpo, y representa por tanto la diana de especificidad de un anticuerpo.

El término "proteína de fusión" se refiere a una molécula proteica única de origen natural, sintético, semisintético o recombinante que comprende la totalidad o una parte de dos o más polipéptidos heterólogos.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos, y no a una longitud específica; así, péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de un polipéptido.

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

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

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

Como se define en el presente documento un, "régimen de tratamiento" es un régimen en el cual se administran uno o más agentes terapéuticos o profilácticos a un sujeto mamífero a una dosis concreta (por ejemplo, nivel, cantidad, concentración) y con un calendario particular o en intervalos particulares (por ejemplo, minutos, días, semanas,

meses).

Tal como se define en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en las condiciones de administración, tal como una cantidad suficiente para inhibir (es decir, reducir, prevenir) la inflamación en una articulación (por ejemplo, mediante la inhibición de la agregación de células, por ejemplo, sinoviocitos, que expresan cadherina-11). La eficacia de una terapia (por ejemplo, la reducción de la inflamación en la articulación y/o la prevención de la inflamación de una articulación) puede determinarse mediante métodos adecuados (por ejemplo, métodos de obtención de imágenes, como IRM, RMN, TC).

10 Cadherinas

Las cadherinas pertenecen a una amplia familia de moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} que median la adhesión celular mediante la unión a otras cadherinas en una forma homotípica (MJ Wheelock y KR Johnson, Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 19: 207-235 (2003)). Las cadherinas clásicas son proteínas transmembrana de paso único que contienen cinco dominios extracelulares de cadherina (CE), cada uno de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, una región transmembrana y un dominio citoplasmático conservado. Las cadherinas se dividen en cadherinas de tipo I o II, en función del grado de homología entre dominios EC. Las cadherinas de tipo II incluyen las cadherinas-5, 6, 8, 11, y 12, y MN-cadherina, humanas. La importancia relativa del papel de cada dominio extracelular en la mediación de la unión intercelular no está claro.

20 Actividad cadherina-11 en sinoviocitos

La cadherina-11 media en la unión entre sinoviocitos en el revestimiento sinovial de juntas articulares (Valencia et al., J. Exp. Med. 200(12):1673-1679 (2004); Kiener y Brenner, Arthritis Res Ther. 7(2):49-54 (2005)). Una proteína de fusión que comprende los cinco dominios extracelulares de cadherina de la cadherina-11 humana, unida al dominio bisagra-CH₂-CH₃ de la IgG₂ humana, inhibió la formación del revestimiento de sinoviocitos *in vitro* (Kiener et al., Am. J. Pathol. 168 (2006)). Además, los anticuerpos antagonistas dirigidos contra cadherina-11 y una proteína de fusión que componían EC1-5 de cadherina-11 de murino, unida a los dominios bisagra-CH₂-CH₃ de la IgG_{2a} de murino, inhibió la inflamación y la hinchazón articular en modelos de la artritis reumatoide en murino (Lee et al., Science 315:1006-1010 (2007)).

Antagonistas de la cadherina-11

Un "antagonista de la cadherina-11" se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 e inhibe (por ejemplo, reduce, previene) una o más actividades mediadas por la cadherina-11 en una célula. Las actividades mediadas por la cadherina-11 incluyen, pero no se limitan a, agregación de células que expresan cadherina-11 sobre la superficie de la célula, y expresión o decrecimiento de factores tales como, por ejemplo, colagenasa, serina proteasas, MMP1, MMP3, IL-6, IL-8 o RANKL/TRANCE. El agente es un anticuerpo.

40 Anticuerpos cadherina-11

Como se describe en el presente documento, los anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de la parte del extremo N del dominio EC1 de la cadherina-11 humana que comprende las secuencias donantes y el bolsillo de unión a cadherina de Cad-11 (por ejemplo, SEQ ID NO:3), bloquean la actividad de la cadherina-11 *in vitro* de forma más eficaz que los anticuerpos que se unen a epítopos en otras regiones de esta proteína (véanse los Ejemplos 1 y 2).

De acuerdo con ello, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo que está presente en la parte del extremo N del dominio EC1 de una proteína cadherina-11 que comprende las secuencias donantes y el bolsillo de unión de Cad-11. Se pretende que el término "anticuerpo" abarque todos los tipos de anticuerpos policlonales y monoclonales (por ejemplo, anticuerpos humanos, quiméricos, humanizados, primatizados, venerizados, monocatenarios y de dominio (dAbs) y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab)', dAb). (Véase, por ejemplo, Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En una realización particular, el anticuerpo específico del dominio EC1 de Cad-11 es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos específicos del dominio EC1 de Cad-11 también se pueden unir directa o indirectamente a un agente citotóxico.

Otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una parte del extremo N del dominio EC1 una proteína Cad-11 e inhiben la actividad de la proteína Cad-11 también se pueden producir, construir, diseñar mediante ingeniería genética o aislar por los métodos convencionales u otras técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos que son específicos para el dominio EC1 de una proteína cadherina-11 se pueden sensibilizar contra un inmunógeno apropiado, tal como un péptido recombinante del dominio EC1 de cadherina-11 (por ejemplo, humano) (por ejemplo, SEQ ID NO:3) o una parte del mismo (que incluye moléculas sintéticas, por ejemplo, péptidos sintéticos). Se ha descrito varios métodos (véase, por ejemplo, Kohler et al., Nature, 256: 495-497 (1975) y Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein et al., Nature 266: 550-552 (1977J); Koprowski et al., patente de los EE.UU. n° 4.172.124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, verano 1994), Ausubel, F.M. et al., Eds., (John Wiley & Sons:

Nueva York, NY), Capítulo 11, (1991)). Los anticuerpos también se pueden sensibilizar inmunizando un hospedador adecuado (por ejemplo, un ratón) con células que expresan el dominio EC1 de cadherina-11 (por ejemplo, líneas celulares o células cancerosas) o células diseñadas mediante ingeniería genética para expresar el dominio EC1 de cadherina-11 (por ejemplo, células transfectadas). (Véase, por ejemplo, Chuntharapai et al., *J. Immunol.*, 152:1783-1789 (1994); Chuntharapai et al. patente de los EE.UU. n.º 5.440.021). Para la producción de anticuerpos monoclonales, se puede producir un hibridoma mediante la fusión de una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea de células de mieloma como SP2/0 o P3X63Ag8.653) con células productoras de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos se pueden obtener de la sangre periférica, o preferentemente, del bazo o los ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados inmunizados con el antígeno de interés. Las células fusionadas (hibridomas) se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivo, y clonarse mediante dilución limitada. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada se pueden seleccionar mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante escisión enzimática o mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar fragmentos Fab o F(ab')₂, respectivamente. También se pueden usar otras proteasas con la especificidad de sustrato necesaria para generar los fragmentos Fab o F(ab')₂. Los anticuerpos también se pueden producir en varias formas truncadas utilizando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de detención antes del sitio de detención natural. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una parte de la cadena pesada de F(ab')₂ se puede diseñar para que incluya secuencias de ADN que codifican el dominio CH₁ y la región bisagra de la cadena pesada. Los anticuerpos monocatenarios, y humanos, quiméricos, humanizados o primatizados (injetados con CDR), o los anticuerpos venerizados, así como los quiméricos, los anticuerpos monocatenarios injertados con CDR o venerizados, que comprenden partes derivadas de las diferentes especies, y similares, también están comprendidos en la presente invención mediante el término "anticuerpo". Las diversas partes de estos anticuerpos pueden unirse químicamente por técnicas convencionales, o se pueden preparar como una proteína contigua utilizando técnicas de ingeniería genética convencionales. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada se pueden expresar para producir una proteína contigua. Véase, por ejemplo, Cabilly et al., patente de EE.UU. n.º 4.816.567; Cabilly et al., patente europea n.º 0.125.023 B1; Boss et al., patente de EE.UU. n.º 4.816.397; Boss et al., patente europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger, M.S. et al., documentos WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., patente europea n.º 0.194.276 B1; Winter, patente de EE.UU. n.º 5.225.539; Winter, patente europea n.º 0.239.400 B1; Queen et al., patente europea n.º 0.451.216 B1; y Padlan, E.A. et al., documento EP 0 519 596 A1. Véase también, Newman, R. et al., *BioTechnology*, 10: 1455-1460 (1992), con respecto a anticuerpos primatizados, y Ladner et al., patente de EE.UU. n.º 4.946.778 y Bird, R.E. et al., *Science*, 242: 423-426 (1988)) con respecto a anticuerpos monocatenarios.

Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando tecnología de ADN sintético o recombinante usando métodos convencionales u otras técnicas adecuadas. Los ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc) que codifican las regiones variables humanizadas también se pueden construir usando métodos de mutagénesis mediante PCR para alterar las secuencias de ADN que codifican una cadena humana o humanizada, tal como un molde de ADN de una región variable anteriormente humanizada (véase, por ejemplo, Kamman, M., et al., *Nucl. Acids Res.*, 17: 5404 (1989)); Sato, K., et al. *Cancer Research*, 53: 851-856 (1993); Daugherty, B.L. et al., *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991); y Lewis, A.P. y J.S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)). Usando estos métodos u otros adecuados, también se pueden producir variantes de forma sencilla. En una realización, las regiones variables clonadas (por ejemplo, dAbs) se pueden mutar, y las secuencias que codifican las variantes con la especificidad deseada se pueden seleccionar (por ejemplo, a partir de una biblioteca de fagos; véanse, por ejemplo, Krebber et al., patente de Estados Unidos 5.514.548; Hoogenboom et al., documento WO 93/06213, publicado el 1 de abril de 1993).

También se pueden usar otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos con la especificidad necesaria, incluidos, por ejemplo, métodos que seleccionan un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a anticuerpo (por ejemplo, dAbs) de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de expresión en fago), o se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones). Los animales transgénicos capaces de producir una gama de anticuerpos humanos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Xenomouse® (Abgenix, Fremont, CA)) y se pueden producir usando métodos adecuados (véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Lonberg et al., patente de EE.UU. n.º 5.545.806; Surani et al., patente de EE.UU. n.º 5.545.807; Lonberg et al., documento WO 97/13852).

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo Cad-11 producido mediante el hibridoma H1M1 (número de registro ATCC PTA-9699), que se depositó el 8 de enero de 2009 en la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, Virginia 20108, Estados Unidos de América. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo Cad-11 producido mediante el hibridoma H14 (número de registro ATCC PTA-9701), que se depositó el 8 de enero de 2009 en la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, Virginia 20108, Estados Unidos de América.

Se pueden identificar los anticuerpos que se unen específicamente el dominio EC1 de la cadherina-11 humana, por ejemplo, mediante cribado de bibliotecas de anticuerpos combinatorias comercialmente disponibles (Dyax Corp., MorphoSys AG). Las bibliotecas de anticuerpos combinatorias y los métodos convencionales de cribado de dichas bibliotecas se describen en Hoet et al., *Nature Biotechnology* 25(3):344-348 (2005) y Rauchenberger et al., *J. Biol.*

Chem. 27S(40) :38194-38205 (2003). Como bibliotecas o colecciones de moléculas se pueden preparar también utilizando métodos químicos bien conocidos.

5 Como alternativa, Se pueden identificar anticuerpos murinos que se unen específicamente el dominio EC1 de la cadherina-11 humana, por ejemplo, mediante la inmunización de ratones con dominios de proteína EC1 o péptidos EC1 junto con un adyuvante para romper la tolerancia al antígeno. Estos anticuerpos se pueden analizar para determinar la especificidad y la actividad deseadas y luego humanizarse mediante técnicas conocidas para crear agentes idóneos para el tratamiento de enfermedades humanas.

10 Los agentes que se unen a cadherina-11 se pueden analizar posteriormente para determinar la actividad antagonista a cadherina-11. Por ejemplo, se puede usar una composición que comprende una proteína Cadherina-11 en un ensayo de cribado o unión para detectar y/o identificar agentes que se unen y antagonizan la proteína Cadherina-11. Las composiciones adecuadas para su uso incluyen, por ejemplo, células que expresan naturalmente una proteína Cadherina-11 (por ejemplo, un sinoviocito, extractos de dichas células, una proteína cadherina-11 recombinante.

15 Un agente que se une a una proteína Cadherina-11 se puede identificar en un ensayo de unión competitiva, por ejemplo, en el que se evalúa la capacidad de un agente de ensayo para inhibir la unión de Cadherina-11 a un agente de referencia. El agente de referencia puede ser una proteína Cad-11 de longitud completa o una parte de la misma que comprende el dominio EC1. El agente de referencia se puede marcar con una marca adecuada (por ejemplo, radioisótopo, marca de epitopo, marca de afinidad (por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina), marca de espín, enzima, grupo fluorescente, grupo quimioluminiscente, colorante, metal (por ejemplo, oro, plata), perla magnética) y se puede determinar la cantidad de agente de referencia marcado necesario para saturar la proteína cadherina-11. La especificidad de la formación del complejo entre la proteína cadherina-11 y el agente de ensayo se puede determinar mediante un control adecuado (por ejemplo, agente no marcado, marca sola).

20 La capacidad de un agente de ensayo para inhibir la formación de un complejo entre el agente de referencia y una proteína Cadherina-11 se puede determinar como la concentración del agente de ensayo necesaria para inhibir el 50 % (valor CI_{50}) de la unión específica del agente de referencia marcado. La unión específica se define, preferentemente, como la unión total (por ejemplo, marca total en el complejo) menos la unión no específica. La unión no específica se define preferentemente como la cantidad de etiqueta que se sigue detectando en los complejos formados en presencia de un exceso de agente de referencia sin marcar. Los agentes de referencia adecuados para su uso en el método incluyen moléculas y compuestos que unen específicamente a Cadherina-11, por ejemplo, un anticuerpo que se une a cadherina-11.

25 Se puede identificar un agente que antagonice una proteína cadherina-11 mediante el cribado de agentes que tienen una capacidad para antagonizar (reducir, prevenir, inhibir) una o más actividades de la cadherina-11, tales como, por ejemplo, una actividad de unión (por ejemplo, unión Cad-11 homotípica). Dichas actividades se pueden evaluar un ensayo *in vitro* o *in vivo* adecuado. Los ensayos ilustrativos de la actividad de cadherina-11 ilustrativos se han descrito anteriormente (Patel, SD, et al., Cell 124:1255-1268 (2006); Lee et al., Science 315:1006-1010 (2007)).

30 Una vez que se ha identificado un antagonista de la cadherina-11, la capacidad del antagonista de la cadherina-11 para interferir con (por ejemplo, reducir, inhibir, prevenir) una o más funciones o propiedades biológicas asociadas con la actividad de la cadherina-11 en una célula se puede evaluar, por ejemplo, mediante un ensayo basado en células diseñado para medir una determinada función o propiedad biológicas asociados con la cadherina-11. Las funciones y propiedades biológicas conocidas por estar asociadas con la expresión y/o actividad de Cadherina-11 incluyen, pero no se limitan a, adhesión celular, migración celular, invasión celular, clasificación celular, condensación celular, reordenación celular, mantenimiento de la integridad y arquitectura tisular, inhibición mediante contacto de la proliferación celular y la transformación maligna de células cancerosas (por ejemplo, tumor) (Kiener y Brenner, Arthritis Res Ther. 7(2):49-54 (2005)). Además, Se ha demostrado en el presente documento que los antagonistas de Cad-11 inhiben la producción de MMP activo por los sinoviocitos. Los ensayos adecuados para evaluar una o más de las funciones biológicas de cadherinas son conocidos de los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Patel, SD, et al., Cell 124:_1255-1268 (2006)) e incluyen, por ejemplo, el ensayo de agregación celular descrito en el presente documento (véase la Ejemplificación, sección de Materiales y métodos).

35 Terapia

Aunque sin desear quedar ligado por teoría particular alguna, se cree que los aproximadamente 35 primeros aminoácidos (por ejemplo, de aproximadamente 33 a aproximadamente 37 aminoácidos) del dominio EC1 de Cad-11 son necesarios para la unión homotípica de la cadherina, y que los agentes que se unen específicamente a esta región de Cad-11 pueden inhibir eficazmente la unión entre moléculas Cad-11. De acuerdo con ello, dichos agentes son útiles en el tratamiento y la prevención de trastornos inflamatorios articulares (por ejemplo, artritis reumatoide) asociados con la expresión y actividad de Cad-11 en sinoviocitos y otros tipos de células en las articulaciones inflamadas. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere al anticuerpo definido en el presente documento para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio articular en un sujeto mamífero.

65 Utilizando la invención, se puede tratar un trastorno inflamatorio articular en un mamífero (por ejemplo, un ser humano)

mediante la administración del antagonista de la cadherina-11 anteriormente definido en una cantidad que es suficiente para proporcionar un efecto terapéutico, por ejemplo, mediante la inhibición de la agregación de células, o mediante la inhibición de la migración de las células, o mediante la inhibición de la expresión de proteasas activas o moléculas inflamatorias por células, que expresan cadherina-11 en una articulación (por ejemplo, sinoviocitos).

5 De acuerdo con ello, un aspecto de la invención se refiere al anticuerpo definido en el presente documento para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio articular en un sujeto mamífero. El trastorno inflamatorio articular puede ser cualquier trastorno que esté asociado o caracterizado por la expresión de Cadherina-11 en las células (por ejemplo, sinoviocitos) de una articulación. Los ejemplos de trastornos inflamatorios articulares que se pueden tratar mediante la presente invención incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, artritis psoriática, síndrome de Reiter y espondilitis anquilosante. En una realización particular, el trastorno inflamatorio articular es artritis reumatoide.

15 En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de la cadherina-11 se administra a un paciente que lo necesita. La cantidad del antagonista de la cadherina-11 a administrar (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz) se puede determinar por un médico usando las directrices proporcionadas en el presente documento y con otros métodos conocidos en la técnica y que depende de varios factores entre los que se incluyen, por ejemplo, el agente concreto seleccionado, la edad del sujeto, sensibilidad, tolerancia a fármacos y el bienestar general. Por ejemplo, la dosis adecuada de los antagonistas de Cad-11 que son anticuerpos pueden ir de aproximadamente 0,01 mg/kg a 300 mg/kg de peso corporal por tratamiento y preferentemente de aproximadamente 20 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por tratamiento. La determinación de la dosis de un agente concreto, paciente y cáncer, está bien comprendido entre las capacidades de un experto en la materia. Preferentemente, la dosis no produce, o produce en cantidad mínima, efectos secundarios adversos (por ejemplo, respuesta inmunogénica, náuseas, mareos, problemas gástricos, síndromes de hiperviscosidad, insuficiencia cardíaca congestiva, ictus, edema pulmonar).

30 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de la cadherina-11 se puede administrar sola, o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, agentes antiinflamatorios). Los agentes antiinflamatorios que son útiles para tratar trastornos inflamatorios articulares, especialmente AR, que se pueden administrar junto con los antagonistas de Cad-11 de la invención, incluyen, pero no se limitan a, (i) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES; por ejemplo, detopofeno, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumeona, naproxeno sodio, oxaprozina, piroxicam, sulindac, tolmetina, celecoxib, rofecoxib, aspirina, salicilato de colina, salsalto, y salicilato de sodio y magnesio); (ii) los esteroides (por ejemplo, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona); (iii) DMARD, es decir, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (por ejemplo, ciclospóna, azatioprina, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, hidroxcloroquina, sulfasalazina, D-penicilamina, minociclina, y oro); o (iv) proteínas recombinantes (por ejemplo, ENBREL® (etanercept, un receptor de TNF soluble), REMICADE® (influximab, un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra TNF), ORENCIAO (abatabcept, un receptor de CTLA4 soluble), ACTEMRA® (Tocilizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de IL-6), y RITUXAN® (rituximab, un anticuerpo monoclonal de CD20).

45 Por lo tanto, el antagonista de la cadherina-11 anteriormente definido se puede administrar como parte de un tratamiento combinado (por ejemplo, con uno o más agentes terapéuticos adicionales). El antagonista de Cad-11 se puede administrar antes, después o en paralelo con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, el antagonista de la cadherina-11 y otro agente terapéutico se pueden coadministrar simultáneamente (p. ejemplo, en paralelo) en formulaciones tanto independientes como combinadas. Como alternativa, los agentes se pueden administrar secuencialmente, como composiciones independientes, dentro de un marco temporal apropiado según determine el médico experto (por ejemplo, un tiempo suficiente para permitir la superposición de los efectos farmacéuticos de los tratamientos). El antagonista de la cadherina-11 y uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar en una sola dosis o en dosis múltiples, en un orden y en un calendario conveniente para lograr un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, una reducción y/o inhibición de la inflamación de las articulaciones). Un médico puede determinar las dosis y regímenes de administración adecuados, que dependen del agente o agentes seleccionados, la formulación farmacéutica y la vía de administración, diversos factores del paciente y otras consideraciones.

55 La eficacia de una terapia (por ejemplo, la reducción o eliminación de la inflamación de las articulaciones, y/o la prevención o inhibición de la inflamación de las articulaciones) se puede determinar mediante cualquier método apropiado (por ejemplo, obtención de imágenes (IRM, RMN)).

60 De acuerdo con la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de Cad-11 definido anteriormente se administra a un sujeto mamífero para tratar un trastorno inflamatorio articular. La expresión "sujeto mamífero" se define en el presente documento para incluir mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones, u otras especies bovinas, equinas, caninas, felinas, de roedores y murinos.

65 Los agentes que son antagonistas de Cad-11 se pueden administrar a un sujeto mamífero por varias vías. Por ejemplo,

el agente se puede administrar mediante cualquier vía parenteral o no parenteral adecuada, incluidos, por ejemplo, por vía tópica (por ejemplo, crema, pomada), o por vía nasal (por ejemplo, solución, suspensión). La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, la administración intraarticular, intramuscular, intravenosa, intraventricular, intraarterial, intratecal, subcutánea o intraperitoneal. El agente también se puede administrar por vía oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones, comprimidos o en la dieta), transdérmica, intradérmica, tópica, mediante inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal, inhalación oral o gotas intranasales), transmucosal o rectal. La administración puede ser local o sistémica, según sea adecuado, y se puede usar simultáneamente más de una vía, si se desea. La administración localizada de un antagonista de Cad-11 se puede llevar a cabo mediante inyección intraarticular (por ejemplo, inyección directa del agente en una articulación). El modo de administración preferido puede variar dependiendo del agente particular seleccionado. Sin embargo, la administración sistémica intravenosa o subcutánea se prefiere generalmente para los anticuerpos.

La administración también se puede realizar mediante inyección en el cerebro o en la cavidad corporal de un paciente o utilizando sistemas de administración con matriz de liberación sostenida o de liberación temporalizada, o mediante la administración en el sitio usando micelas, geles y liposomas. Los dispositivos nebulizadores, inhaladores en polvo, y soluciones en aerosol son representativas de los métodos que se pueden usar para administrar dichas preparaciones al tracto respiratorio. La administración puede ser *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

Los agentes que son antagonistas de la cadherina-11 se pueden administrar a un sujeto mamífero como parte de una composición farmacéutica o fisiológica, por ejemplo, como parte de una composición farmacéutica que comprende un antagonista de la cadherina-11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones o composiciones que comprenden un antagonista de la cadherina-11 o las composiciones que comprenden un antagonista de la cadherina-11 y uno o más agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, un agente anti-inflamatorio) variarán de acuerdo con la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión o cápsula). Los vehículos farmacéuticos aceptables pueden incluir ingredientes inertes que no interactúan con el antagonista de la cadherina-11. Se pueden utilizar técnicas de formulación farmacéutica convencionales, tales como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Los vehículos farmacéuticos adecuados para administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, suero salino fisiológico, suero salino bacteriostático (suero salino que contiene aproximadamente un 0,9 % mg/ml de alcohol bencílico), suero salino tamponado con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Las formulaciones también pueden incluir pequeñas cantidades de sustancias que mejoran la eficacia del principio activo (por ejemplo, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes tamponadores del pH, agentes humectantes). Los métodos de encapsulación de composición (como con un revestimiento de gelatina dura o ciclodextrano) son conocidos en la materia. Para inhalación, el agente se puede solubilizar y cargar en un dispensador adecuado para su administración (por ejemplo, un atomizador o nebulizador o dispensador de aerosol presurizado).

El agente farmacéutico se puede administrar como un compuesto neutro o como una sal o éster. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con los grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico o tartárico, y las formadas con los grupos carboxilo libres tales como las derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc. Las sales de compuestos que contienen una amina u otro grupo básico se pueden obtener, por ejemplo, mediante reacción con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido acético, ácido perclórico y similares. Los compuestos con un grupo amonio cuaternario también contienen un contraión tal como cloruro, bromuro, yoduro, acetato, perclorato y similares. Las sales de compuestos que contienen un ácido carboxílico u otros grupos ácidos funcionales se pueden preparar por reacción con una base adecuada, por ejemplo, una base de hidróxido. Las sales de grupos ácidos funcionales contienen un contraión tal como sodio o potasio.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos, que no se pretende que sean limitantes en forma alguna.

Ilustración

Ejemplo 1: Identificación de Fab con especificidad de unión para un epítipo dentro del extremo N de 35 aminoácidos del dominio EC1 de la cadherina-11 humana.

Materiales y métodos

Transferencia Western

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (NC) utilizando métodos convencionales. En resumen, una membrana NC se enjuagó con suero salino tamponado con fosfato-tween (TBST) (8,8 g/l de NaCl, 0,2 g/l de KCl, 3 g/l de base Tris, 500 ul/l de Tween-20, pH a 7,4). La membrana se bloqueó con BSA al 4 % en TBST disuelto por hora a 22°C. La membrana NC se enjuagó 3X durante 5 min cada vez con TBST. El anticuerpo de ratón dirigido contra Cad-11 humana se diluyó hasta 0,5 µg/ml en TBST y la NC se incubó durante 1 h a 22°C. La membrana NC se enjuagó 3X durante 5 minutos cada vez con TBST. El anticuerpo de cabra dirigido

contra Ig de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se diluyó a 1 µg/ml en TBST y la membrana NC se incubó en la solución secundaria durante un mínimo de 1 h a temperatura ambiente a 22°C. La membrana NC se enjuagó 3X durante 5 min cada vez con TBST. La señal se reveló usando un método HRP convencional.

5 ELISA

El antígeno (5 µg/ml o 50 µg de Cad-11-EC-1-Fc o 5 µg/ml del péptido cadherina) se diluyó en tampón y se utilizó para recubrir las placas durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron y se bloquearon a continuación con BSA al 1,5 %, leche desnatada en polvo al 5 % en tampón de dilución PBS: BSA al 1,5 %, leche desnatada en polvo al 2,5 %, Tween-20 al 0,1 % en PBS. A continuación, las placas se incubaron con lisado bacteriano que contiene los Fab dirigidos contra Cad-11 humana o Fab purificados dirigidos con tras Cad-11 humana durante 1 h. Tras el lavado, el anticuerpo secundario (a-hu-Fab conjugado con Cy5 diluido 1/100) se aplicó durante 25 min. A continuación, las placas se lavaron y se leyó la fluorescencia resultante.

15 Resultados

Tres conjuntos de anticuerpos específicos de cadherina-11 anteriormente notificados se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para unirse al dominio EC1 de la Cadherina 11. Estos anticuerpos incluían anticuerpos que se habían sensibilizado contra una proteína de fusión cadherina-11-Fc inmunógena en ratones genéticamente desactivados o deficientes para la cadherina-11 (Lee et al., Science 315:1006-1010 (2007)), anticuerpos que se sensibilizaron en ratones de tipo silvestre cadherina-11 contra una proteína de fusión cadherina-11-Fc humana que se había producido en células CHO (Valencia et al., J. Exp. Med. 200(12):1673-1679 (2004)), y anticuerpos que se sensibilizaron en ratones de tipo silvestre Cadherina-11 contra una proteína producida bacteriológicamente que contiene dominios CE1-3 de la cadherina 11. Estos anticuerpos se analizaron mediante transferencia Western para determinar la capacidad de las proteínas de fusión que contienen solamente el dominio EC1 de la Cad-11 humana (Cadherina-11-EC1-Fc), los dominios EC1 y EC2 de Cad-11 (Cad11-EC1/2-Fc) o los 5 dominios EC de Cad-11 (Cadherina-11-EC1-5-Fc). Ninguno de los anticuerpos analizados reconoció las proteínas de fusión EC1-Fc o EC1-2-Fc en una transferencia Western (FIG. 1A). Sin embargo, los anticuerpos de cada uno de los tres conjuntos analizados reconocieron la proteína de fusión Cad-11-Fc humana que incluye los dominios extracelulares 1 a 5 (FIG. 1B). Estos resultados indican que los anticuerpos analizados no se unen a los dominios EC1 o EC2 de Cad-11 humana, pero reconocen epítomos en otra parte de la región extracelular de dicha proteína.

Los anticuerpos dirigidos contra Cad11 publicados que se unen a células que expresan Cad11, 13C2, 23C6, 5F82 (Lifespan Science) y 283416 (R&D Systems), así como el anticuerpo H1M1 que se une a EC1 de Cad11, y el anticuerpo de control, MOPC, se analizaron mediante ELISA para determinar la capacidad de unirse a proteínas de fusión que incluyen solamente el dominio EC1 de la Cad-11 humana (cadherina-11-EC1-Fc) o los 5 dominios EC de Cad-11 (Cadherina-11-EC1-5-Fc). Ninguno de los anticuerpos dirigido contra Cad11 publicados reconocieron la EC1-Fc (FIG. 1B, barras abiertas) (no se muestran los datos de 283416). Sin embargo, el anticuerpo H1M1 de unión a EC1 de Cad11 se unió tanto a Cadherina-11-EC1-Fc como a Cadherina-11-EC1-5-Fc (FIG. 1B barras cerradas). El anticuerpo de control MOPC no se unió a ninguna proteína de fusión. Estos resultados indican que los anticuerpos dirigidos contra Cad 11 disponibles publicados no se unen al dominio EC1 de la Cad-11 humana, pero reconocen epítomos en otra parte de la región extracelular de dicha proteína.

Para crear un anticuerpo específico de un epítomo dentro del extremo N de 35 aminoácidos del dominio EC1 de la cadherina-11, se cribó una biblioteca de expresión en fago (MorphoSys AG) que codifica Fab humanos. Los Fab candidatos se identificaron mediante dos criterios de selección - una selección positiva para unión a un péptido que incluye los 35 primeros aminoácidos del dominio EC1 de la cadherina-11 humana, y una selección negativa para unión a los correspondientes péptidos de los dominios EC1 de dos cadherinas muy relacionadas y fuertemente homólogas, cadherina-8 y MN-Cadherina (FIG. 2). Se utilizó ELISA para evaluar la unión.

Se realizaron dos cribados. En el primer cribado, Se identificaron mediante ELISA 96 clones Fab que se unían a EC1 del péptido cadherina-11. Siete (7) Fab candidatos se unieron al péptido EC-1 de Cad-11; sin embargo, solo dos de estos se unieron tanto al péptido EC-1 como a la proteína de fusión EC1-2-Fc. Uno de estos dos Fabs también se unió al péptido MN-Cad. De acuerdo con ello, solo uno de los siete clones Fab se unió específicamente a la proteína de fusión EC1-Fc, pero no se unió a los péptidos del dominio EC1 de MN-Cad o cadherina-8. En un segundo cribado, se observaron resultados similares, ya que solamente 1 de 96 Fab (clon F9) mostró especificidad para el péptido EC1 de Cadherina-11 y la proteína de fusión EC1-2-Fc, y no se unió a los péptidos del dominio EC1 de MN-Cad o cadherina-8. La mayoría de los Fab de unión al dominio EC1 de Cad-11 analizados mostraron reactividad cruzada con el péptido MN-Cad, que contiene una secuencia EEY CAR que solapa con la secuencia EEY CAR de Cad-11.

Ejemplo 2: Un Fab que se une al dominio EC1 de cadherina-11 inhibe la agregación celular mediada por Cad-11 en un ensayo *in vitro*

65 Materiales y métodos

Ensayo de agregación *In vitro* de cadherina-11

Células 431-D crecieron en suspensión y no expresen normalmente ninguna cadherina y no se agregan. Las células 431-D-11 se modificaron genéticamente para expresar Cad-11.

5 Cuando las células 431-D-11 se incubaron en medio solo, y comenzaron a agregarse durante 40 min, y los
 aglomerados celulares sedimentaron en el fondo del pocillo, y las células restantes no agregadas en suspensión se
 pueden medir y calcularse el porcentaje de células 431-D-11 agregadas. Para el ensayo de agregación, se hicieron
 10 crecer células 431-D-11 (células D-11) hasta subconfluencia en un matraz y después se extrajeron del matraz usando
 tripsina al 0,05 % y EDTA 0,53 mM. Se añadieron aproximadamente 2×10^6 células 431-D-11 a 2 ml de medio SME
 (medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa, Hepes 0,1 M pH 7,4 y 5 U/ml ADNsa) y se
 preincubaron durante 15 min sobre hielo, tanto en ausencia como en presencia de un agente de ensayo (por ejemplo,
 15 anticuerpo, Fab, proteína de fusión). Tras la preincubación con el agente de ensayo, las células se transfirieron a un
 pocillo de fondo redondo de una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37°C con rotación a 130 rpm en un agitador
 rotatorio. A medida que las células se agregan, se hunden hasta el fondo del pocillo. A 0 min y 40 min, se extrajeron
 200 µl de la parte intermedia de la muestra del pocillo, y se mezclaron con 25 µl de glutaraldehído al 8 % para fijar las
 células. 200 µl de la muestra fijada se agregaron a 9.8 ml de una solución salina isotónica Coulter Counter y se
 centraron usando un Coulter Counter configurado un umbral de 8 µm a 24 µm. Se registraron 3 recuentos de celdas
 por muestras. Se calculó el porcentaje de disminución de células o células agregadas a los 40 min, en comparación
 con el porcentaje en el punto temporal de 0 min.

Resultados

Un Fab candidato (clon F9) que tiene especificidad de unión para un epítipo dentro del extremo N de 35 aminoácidos
 del dominio EC1 de la cadherina-11, que no se une a los dominios EC1 de MN-CAD o CAD-8, se analizó para
 25 determinar la capacidad de inhibir la agregación celular mediada por Cad-11 *in vitro* utilizando un ensayo de
 agregación de células Cadherina-11. El Fab candidato inhibió significativamente la agregación de células mediada por
 cadherina-11 a concentraciones de 1 µg/ml o menores (FIGS. 4 y 5). Por el contrario, un Fab fabricado a partir del
 anticuerpo 13C2 que se une a un epítipo en la región extracelular de Cad-11 fuera de los dominios EC1/2 inhibió la
 agregación de cadherina-11 solamente en una concentración de 10 µg/ml, lo que sugiere que el Fab F9 Fab inhibe la
 30 actividad de Cad-11 más eficazmente a concentraciones más bajas que los anticuerpos que se unen a otras partes del
 dominio extracelular de Cad-11.

La agregación celular mediada por Cad-11 también quedó inhibida mediante diferentes Fab del dirigidos contra
 Cadherina-11-dominio EC1 que eran específicos de Cad-11 solamente, Cad-11 y Cad-8, Cad-11 y MN-Cad, o Cad-11,
 35 Cad-8 y MN-Cad (FIGS. 6 y 7). Todos los Fab específicos del dominio EC1 de cadherina que se analizaron inhibieron
 la agregación celular *in vitro* con respecto a las muestras del control (por ejemplo, medio SME (FIG. 6), un Fab
 específico de GFP (FIG. 7).

Ejemplo 3: Generación de proteínas de fusión cadherina-11/inmunoglobulina que contienen el dominio EC1 de la
 40 cadherina-11 humana.

La región EC1 de Cadherina-11 se preparó a partir de un vector que codificaba el ADNc de longitud completa de la
 cadherina-11 humana (Cad-11 humana clonada en los sitios NotI y Kpn-1 del vector Invitrogen pCEP4®) usando la
 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en condiciones convencionales usando los siguientes cebadores
 45 oligonucleótido para introducir los sitios EcoRI y BglII (véanse las secuencias subrayadas de los cebadores directo e
 inverso, respectivamente), en el producto amplificado:

Cebador directo:

tttttttgaattcatgaaggagaactactgtttacaagc (SEQ ID NO:8)
EcoRI

50

Cebador inverso:

tttttttagatctctggaccttgacaatgaattccgacgg (SEQ ID NO:9)
BglII

55 El producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción EcoRI, BglII, y el producto de digestión se asiló y se
 ligó en el vector pFUSE-hlgG2e1-Fc1 (InvivoGen) usando los correspondientes sitios EcoRI y BglII. Bacterias TOP10
 competentes (Invitrogen) se transformaron como describe en fabricante con el producto de unión, y las bacterias con el
 plásmido Cadherina-11-EC1-Fc se seleccionaron con neomicina. Se aisló el plásmido Cadherina-11-EC1-Fc, se
 secuenció y posteriormente se utilizó para transfectar transitoriamente células 293F. Se recogió medio acondicionado,
 60 y la proteína de fusión Cadherina-11-EC1-Fc (SEQ ID NO:9) se purificó usando filtración en flujo tangencial seguido
 por aislamiento en una columna mixta 50/50 de proteína A/proteína G equilibrada con Hepes 20 mM pH 7,4, NaCl 137
 mM, KCl 3 mM y CaCl2 1 mM.

La proteína de fusión Cadherina-11-EC1-Fc purificada se eluyó de la columna usando glicina 0,1 M (pH 3) y CaCl₂ 1 mM y se introdujo en tubos que contenían 200 µl de Tris 1 M pH 7,4, y CaCl₂ 1 mM. Los eluatos con la proteína de fusión Cad-11 se dializaron a continuación contra Hepes 20 mM (pH 7,4), NaCl 137 mM, KCl 3 mM y CaCl₂ 1 mM. El tamaño de la proteína se confirmó mediante SDS PAGE (FIG. 10) y su identidad se confirmó mediante análisis Western usando un anticuerpo que reconoce la región Fc humana (FIG. 11) y la secuencia del extremo N (no se muestra). Cad-11-EC1-2-Fc se produjo usando técnicas y condiciones similares a las anteriormente descritas.

Ejemplo 4: Una proteína de fusión de inmunoglobulina Cad-11-EC1-Fc inhibe la agregación celular mediada por Cad-11 en un ensayo *in vitro*

Materiales y métodos

Invasión/migración celular en un lecho de matrigel

La actividad migratoria FLS se evaluó en pocillos de transfección revestidos con ECM Matrigel en medio FLS (medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa, [n.º de catálogo Sigma D7777], suero de feto bovino al 10 % [n.º de catálogo Benchmark 100-106], Penicilina-estreptomicina al 1 % [Gibco 315140-122], L-glutamina al 1 % [n.º de catálogo Gibco 25030], gentamicina al 0.5 % [n.º de catálogo Gibco 15710-064]. Las suspensiones de células FLS humanas en medio FLS que contenían 1x10⁴ células se añadieron a inserciones de control o inserciones revestidas con matrigel introducidas en una placa de 24 pocillos que contenían 0,750 ml de medio FLS. A continuación, las placas se incubaron en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada a 37°C, 5 % CO₂ durante 22 horas.

Para calcular el número de células que migran, las células no invasoras se retiraron de la superficie superior de las inserciones de membrana de control frotando con un hisopo de algodón. Se repitió un segundo frotis con hisopo de algodón humedecido con medio FLS. A continuación, las inserciones de control se fijaron y se tiñeron con un kit de tinción diferencial kit [n.º de catálogo Fisher 122-911]. Las inserciones se dejaron secar, y las células se contaron en 4 cuadrantes de la inserción de control usando un microscopio con un objetivo 10x. Se contaron inserciones por triplicado, y los totales se promediaron.

Para calcular el número de células que invaden las inserciones matrigel, las células no invasoras se retiraron suavemente de la superficie superior de las inserciones de matrigel frotando con un hisopo de algodón. Se repitió un segundo frotis con hisopo de algodón humedecido con medio FLS. A continuación, las inserciones se fijaron y se tiñeron con un kit de tinción diferencial kit [n.º de catálogo Fisher 122-911]. Las inserciones se dejaron secar, y las células se contaron en 4 cuadrantes de la inserción de control usando un microscopio con un objetivo 10x. Se contaron inserciones por triplicado, y los totales se promediaron.

Resultados

Cad-11-EC1-Fc inhibió significativamente la agregación de células a una concentración de 3 µg/ml, mientras que la proteína Cad-11-EC1-5-Fc de longitud completa que contenía los 5 dominios de Cad-11 humana inhibió la agregación mediada por Cad-11 a una concentración de 100 µg/ml (FIG. 13). Estos datos muestran que la proteína de fusión de inmunoglobulina Cad-11-EC1-Fc inhibe eficazmente la agregación celular mediada por Cad-11 en un ensayo *in vitro*.

Además, la capacidad de la proteína de fusión de inmunoglobulina Cad-11-EC1-Fc para inhibir la invasión de fibroblastos humanos análogos a (SFL) a los sinoviocitos (FLS) en un lecho de matrigel se ensayó *in vitro*. La invasión de los FLS al interior del matrigel es un proceso complejo que involucra la expresión de MMP1, MMP-3, MMP-13, serina proteasas, y otras proteínas mediante los FLS para degradar el matrigel, así como la migración de los FLS al interior del matrigel. En un ensayo independiente, los investigadores no observaron ninguna inhibición de migración de FLS a través de una inserción de fibra normal. Esto sugiere que la influencia del mAb EC-Fc o 13C2 mAb es inhibir la degradación del matrigel (un sustituto del cartílago articular). Tanto la Cad-11-EC1-Fc como el mAb anti-Cad-11 13C2 murino inhibieron la invasión de FLS en un lecho de matrigel en dos experimentos independientes.

Ejemplo 5: Generación de anticuerpos contra un péptido del dominio EC1 de la cadherina 11

Materiales y Métodos

Ratones balb/c se inmunizaron quincenalmente en la almohadilla de la pata nueve veces durante un período de un mes con 0,01 mg de un péptido correspondiente a los primeros 33 aminoácidos del dominio EC1 de Cad-11 humana (GWVWN QFFVI EEYTG PDPVL VGRLH SDIDS GDG (SEQ ID NO:10) unido covalentemente a BSA. Este péptido se denomina en el presente documento como Péptido 4. Se recogieron los bazo de los ratones inmunizados, y se fusionaron con un compañero de fusión murino, P3X63-Ag8.653, para generar hibridomas productores de anticuerpos. Los hibridomas se expandieron y subclonaron a 10, 3 o 0,5 células/pocillo, y el medio que contiene anticuerpos contra Cad-11 procedentes de los hibridomas se analizaron en un ELISA para determinar la capacidad para unirse específicamente a la proteína que contiene el dominio EC1-2 de Cad-11 producida en las bacterias. El medio que

contiene anticuerpos contra Cad-11 procedente de estos hibridomas de péptido 4 se cribaron en paralelo para determinar la ausencia de unión a las proteínas que contienen los dominios EC1-2 de la Cad-8 y MN-Cadherina humanas. Placas EIA de 96 pocillos se revistieron durante la noche a 4°C con 0,05 ml de 0.0 a 0,3 mg/ml de cada una de las proteínas EC1-2 Cad y a continuación se lavaron varias veces con suero salino tamponado. A continuación, las
 5 placas se bloquearon con 0,25 ml de tampón caseína-PBS y se lavaron varias veces con suero salino tamponado. El medio de hibridomas que contiene anticuerpos contra Cad-11 se incubó puro en cada pocillo durante 1 h a 22°C y a continuación se lavó dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de ratón, se incubaron durante 30 min a 22°C, y a continuación se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo TMB (3,3,5,
 10 5'-tetrametilbencidina) a temperatura ambiente a cada pocillo, y se dejó revelar el color durante 5 min a 22°C. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2 N a temperatura ambiente y la placa se leyó a 450 nm en una placa de microtitulación Wallac 1420.

La especificidad de los anticuerpos H1M1 y H14 anti-Cad-11 se analizó adicionalmente mediante ELISA contra los 33
 15 primeros aminoácidos de los dominios EC1 de Cad-11, Cad-7, Cad-8, Cad-20, Cad-24, Cad-9, Cad-18, y MN-Cad. Los péptidos correspondientes a la región de Cad-7, Cad-8, Cad-20, Cad-24, Cad-9, Cad-18, MN-Cad que solapaban con la región G1- G33 del dominio EC1 de Cad-11 se sintetizaron y se conjugaron con biotina. 100 µl de una solución 30 ng/ml de cada uno de estos péptidos en PBS-Tween (0,05 %) se incubaron en cada pocillo de una placa Netravidín de 96 pocillos durante 2-3 h a 4°C y a continuación se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se incubaron varias
 20 concentraciones del anticuerpo anti-Cad-11 en cada pocillo durante 1 h a 22°C y a continuación se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de ratón, se incubaron durante 30 min a 22°C, y a continuación se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo TMB (3,3,5, 5'-tetrametilbencidina) a temperatura ambiente a cada pocillo, y se dejó revelar el color durante 5 min a 22°C. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2 N a temperatura ambiente y la placa se leyó a 450 nm en una placa de microtitulación Wallac 1420.
 25

El medio de los pocillos que contenían hibridomas de anticuerpo anti-Cad-11 positivos se analizaron para determinar la capacidad de unión a células que expresaban Cad-11. Células 431 D congeladas que expresan Cad-11 se descongelaron y se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que contiene Ca²⁺ (NaCl 0,137 M, 5,4 mM, KCl 0,25 mM, Na₂HPO₄ 0,44 mM, KH₂PO₄ 1,3 mM, CaCl₂ 1,0 mM, MgSO₄ y NaHCO₃ 4,2 mM) y a continuación se resuspendieron a razón de 10⁶ células/ml en HBSS que contiene Ca²⁺. Se tiñeron 10⁵ células/pocillo con un 50 % o 16 % de medio que contiene anticuerpos contra Cad-11 durante 45 min sobre hielo, se lavaron dos veces con HBSS que contiene Ca²⁺, se tiñeron con un anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado con fitoeritrina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a una concentración del 1 % durante 45 min
 30 sobre hielo y a continuación se lavaron dos veces más con HBSS que contiene Ca²⁺. A continuación, las células se resuspendieron en 400 µl de HBSS que contiene Ca²⁺ y formaldehído al 1 %, y posteriormente se analizaron en un FACScalibur (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ) para determinar las células positivas para PE.
 35

Resultados

40 El medio que contiene anticuerpos contra Cad-11 procedente de los hibridomas de péptido 4 unidos a la proteína Cad-11 EC1-2 (FIG. 16, HL vs CAD11), pero no proteínas que contienen dominios EC-2 de Cad-8 y MN-Cad (FIG. 16, HL vs CAD8 y HL vs MNCAD, respectivamente). El medio hibridoma de control no se unió a ninguna de las proteínas cadherina ensayadas (FIG. 16, Medio vs CAD11, Medio vs CAD8, y Medio vs MNCAD). Estos datos demuestran la presencia de anticuerpos específicos de Cad-11 contra los péptidos 4 en los hibridomas.
 45

Dos hibridomas de péptido 4, denominados en el presente documento como H1M1 y H14, se unieron a células que expresaban la proteína Cad-11 humana (FIGS. 17A-C y 17G-I), pero no a las células 431-D Cad-11 de control (FIGS. 17D-17F). La línea celular de hibridoma denominada como H1M1 tiene el número de registro A.T.C.C. PTA-9699, que se depositó el 8 de enero de 2009. La línea celular de hibridoma denominada como H14 tiene el número de registro A.T.C.C. PTA-9701, que se depositó el 9 de enero de 2009. Estos hibridomas contienen anticuerpos dirigidos contra Cad-11 que reconocen las células que expresan tanto Cad-11 como péptido 4 *in vitro*. Se demostró que la unión de estos anticuerpos a células que expresan Cad-11 dependía de la cantidad de anticuerpo de péptido 4 utilizado, como se muestra en las gráficas de titulación de H1M1 (FIG. 18A) y H14 (FIG. 18B) comparadas con la intensidad de tinción celular para la intensidad de fluorescencia promedio (MFI).
 50
 55

Los anticuerpos H1M1 y H14 Péptido 4 dirigidos contra Cad-11 demostraron una unión > 100 veces mayor a Cad-11 que a cualquiera de las otras cadherinas sometidas a ensayo, que incluyeron Cad-7, Cad-8, Cad-20, Cad-24, Cad-9, Cad-18, y MN-Cad. En la mayor parte de casos, no se observó la unión de los anticuerpos H1M1 H14 dirigidos contra Cad-11 a las otras cadherinas. El anticuerpo H14 dirigido contra -Cad-11 mostró una fuerte unión a Cad-11 (FIG. 19A), con una unión 468 veces inferior a Cad-8 (FIG. 19A), y prácticamente sin unión a Cad-7, MN-Cad, Cad-9, Cad-18, Cad-20 o Cad-24 (FIG. 19B). De manera similar, el anticuerpo H1M1 dirigido contra -Cad-11 mostró una fuerte unión a Cad-11 (FIG. 20), con una unión 365 veces inferior a Cad-8 (FIG. 20), y sin unión a Cad-7, MN-Cad, Cad-9, Cad-18, Cad-20 o Cad-24 (no se muestran los datos).
 60
 65

Ejemplo 6: Los anticuerpos H1M1 y H14 dirigidos contra el dominio CE1 de Cad-11 se unen a epítomos del dominio

EC1 de Cad-11 que incluyen la secuencia de aminoácidos GPDP.

Materiales y métodos

5 Para determinar el epítipo dentro del dominio EC1 de Cad-11 al que se unen los anticuerpos H1M1 y H14 del péptido 4 de EC1 de Cad-11, cuatro péptidos diferentes que amplificaban los primeros 37 aminoácidos de la región EC1 (véase la FIG. 22) se inmovilizaron en un formato ELISA y se determinó la capacidad de los anticuerpos H1M1 y H14 para unirse a cada uno de los cuatro péptidos. Placas Reactibind de 96 pocillos se revistieron durante la noche a 4°C con 0,3 ng/pocillo de péptido 1 (aminoácidos G1-P18 del dominio EC1 de Cad-11), 0,3 ng/pocillo de Péptido 2
10 (aminoácidos G15-N34 del dominio EC1 de Cad-11), 0,3 ng/pocillo de Péptido 3 (aminoácidos V19-Y37 del dominio EC1 de Cad-11), 0,3 ng/pocillo de Péptido 4 inmunógeno (aminoácidos G1-G33 del dominio EC1 de Cad-11), 20 ng de una proteína de fusión que incluye la totalidad del dominio EC1 (EFL), o 20 ng de Ig de control humana (Fc-block). Los pocillos se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %), se bloquearon con caseína en dH₂O 3 horas a 22°C y a continuación se lavaron nuevamente dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Varias diluciones de los diferentes anticuerpos del péptido 4 del dominio EC1 de CAD-11 se transfirieron a los pocillos revestidos con péptido o proteína, se incubaron durante 45 minutos a 22 °C y a continuación se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron cada pocillo 100 µl de una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), se incubaron durante 30 min a 22 °C y a continuación se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo TMB a temperatura ambiente a cada pocillo, y
20 se dejó revelar el color durante 5 min a 22°C. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2 N a temperatura ambiente y la placa se leyó a longitud de onda 450 nm en una placa de microtitulación Wallac 1420.

Resultados

25 Los anticuerpos H1M1 de péptido 4 dirigidos contra Cad-11 a 1:11 (FIG. 21A) y H14 a 1:23 (FIG. 21 B) se unieron al péptido 4 inmunógeno (PEP4), así como a la proteína de fusión del dominio EC1 (EFL), en ELISA, según indican las elevadas lecturas DO450 de la placa, con respecto al control. Ninguno de estos anticuerpos se unió a la IgG humana de control (bloqueo Fc). Además, ambos anticuerpos se unieron al péptido 2 (PEP2), pero no al péptido 1 (PEP1) o al péptido 3 (PEP3), en el ELISA (FIGS. 21A y 21B).

30 Estos resultados sugieren que los anticuerpos H1M1 y H14 contra el dominio EC1 de Cad-11 se unen a un epítipo común en los péptidos 2 y 4 que no está presente en el péptido 3 solapante. Los aminoácidos compartidos por los péptidos 2 y 4 que están antes del péptido 3 están destacados en la región recuadrada mostrada en la FIG. 22. Estos cuatro aminoácidos, GPDP (SEQ ID NO:11), que comienzan en G15 del dominio EC1 de Cad-11, son probablemente parte del epítipo reconocido por los anticuerpos por los anticuerpos H1M1 y H14.

Ejemplo 7: Los anticuerpos H1M1 y H14 contra el dominio EC1 de Cad-11 inhiben la agregación de las células que expresan Cad-11 *in vitro*

40 Materiales y métodos

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos Cad-11 para inhibir la agregación celular mediada por Cad-11, 30 µg/ml del anticuerpo H1M1 Péptido 4 se cultivaron con 75.000 células de carcinoma epidermoide A-431-D que expresan Cad-11 en 0,5 ml de medio DMEM con alto contenido de glucosa, HEPES 20 mM pH 7,4, FCS al 10 % y 10 U/ml de ADNasa en una placa de polipropileno con 24 pocillos de fondo redondo. Las placas de 24 pocillos se colocaron en una plataforma giratoria a aproximadamente 60 rpm y se incubaron con CO₂ al 5 % durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se evaluó la agregación celular tras fotografiar las placas con un aumento de 100x (para el experimento con H1M1) o 40x (para el experimento H14).

50 Resultados

En presencia de un anticuerpo control de isotipo (30 µg/ml), las células que expresan Cad-11 formaron grandes masas (FIG. 23A), mientras que las células precursoras negativas para Cad-11 permanecieron como grupos de células individuales o dobles (FIG. 23C). Las células Cad-11 tratadas con H1M1 permanecieron como pequeños agregados de células (FIG. 23B) que no avanzaron para formar las grandes masas obtenidas utilizando el anticuerpo de control.

En el mismo ensayo, el anticuerpo H14 dirigido contra Cad-11 también mostró inhibir la agregación mediada por Cad-11. Aunque las células precursoras que expresan Cad-11 formaron grandes racimos de células agregadas (FIG. 24A), el anticuerpo H14 (FIG. 24B) inhibió la agregación a una concentración de 30 µg/ml, ya que los agregados celulares eran pequeños e infrecuentes. Estos resultados indican que los anticuerpos H1M1 y H14 dirigidos contra Cad-11 inhiben la agregación celular mediada por Cad-11 *in vitro*.

Ejemplo 8: Los anticuerpos dirigidos contra el dominio EC1 de Cad-11, H1M1 y H 14, inhiben la inflamación articular asociada a artritis *in vivo* en un modelo de la artritis reumatoide en murino

65

Materiales y métodos

Estudio 1 - Ratones C57/B16 macho de seis semanas de edad se inyectaron con 150 µl de suero KBN en el día 0 y el día 2. Los ratones tratados con suero KBN recibieron bien inyecciones de solución salina (FIG. 25, triángulos blancos) o se trataron con dosis diferentes del anticuerpo H1M1 dirigido contra EC1 de Cad-11. Los regímenes de tratamiento incluyen dosificación el día 0 con 0,5 mg de anticuerpo/ratón y en días alternos (q2d) después con 0,1 mg de anticuerpo/ratón (0,5 mg+0,1 mg) (FIG. 25, triángulos negros); dosificación el día 0 con 0,5 mg de anticuerpo/ratón (0,5 mg) (FIG. 25, rombos); dosificación en días alternos (q2d) con 0,1 mg de anticuerpo/ratón (0,1+0,1 mg) (FIG. 25, cuadrados); o dosificación en días alternos (q2d) con 0,3 mg de anticuerpo/ratón 0,3 mg+0,3 mg) (FIG. 25, círculos). El grupo control consistía de 5 ratones y el grupo de tratamiento consistía de 7 ratones. La inflamación articular asociada a artritis fue determinado se determinó por mediciones con un calibre tomadas en días alternos.

Estudio 2 - Ratones C57/B16 macho de seis semanas de edad se inyectaron con 150 µl de suero KBN en el día 0 y el día 2, y a continuación se trataron bien con suero salino en días alternos (q2d) (FIG. 26, triángulos), o uno de los anticuerpos dirigidos contra Cad-11, H1M1 (FIG. 26, cuadrados) o H14 (FIG. 26, círculos), a 0,3 mg/dosis q2d. El grupo control consistía de 5 ratones y el grupo de tratamiento consistía de 7 ratones. La inflamación articular asociada a artritis fue determinado se determinó por mediciones con un calibre tomadas en días alternos.

Resultados

Estudio 1 - El anticuerpo H1M1 dirigido contra Cad-11 inhibió la inflamación articular con respecto al ratón de control. La mayor inhibición de la inflamación articular asociada a artritis se observó en los ratones tratados con KBN en dosis de 0,3 mg de anticuerpo H1M1 en días alternos (FIG. 25, círculos).

Estudio 2 - Ambos anticuerpos dirigidos contra Cad-11 inhibieron la inflamación articular con respecto al control. En este estudio, el anticuerpo H14 retrasó significativamente el inicio de la artritis, en comparación con los animales de control (FIG. 27). Todos los animales del grupo control desarrollaron artritis en el día 3, mientras que los ratones tratados con H14 requirieron 6 días antes de que todos los animales desarrollaran artritis.

Estos estudios indican que los anticuerpos dirigidos contra el dominio EC1 de Cad-11 humana pueden inhibir el desarrollo y la gravedad de la artritis *in vivo*.

Ejemplo 9: Generación de anticuerpos contra otro péptido del dominio EC1 de la cadherina 11

Materiales y Métodos

Ratones balb/c se inmunizaron quincenalmente en la almohadilla de la pata nueve veces durante un período de un mes con 0,01 mg de un péptido V19-Y37 (VL VGRLH SDIDS GDGNI KY (SEQ ID NO:12)), correspondiente a 19 aminoácidos del dominio EC1 de Cad-11 humana, unido covalentemente a BSA. Este péptido se denomina en el presente documento como Péptido 3. Se recogieron los bazo de los ratones inmunizados, y se fusionaron con un compañero de fusión murino, P3X63-Ag8.653, para crear hibridomas productores de anticuerpos. Estos hibridomas se expandieron y el medio que contiene anticuerpos contra Cad-11 procedente de los hibridomas se analizó para determinar la capacidad de unión a una proteína correspondiente al dominio EC1-2 de Cad-11, que se produjo en bacterias. El medio que contiene anticuerpos contra Cad-11 procedente de estos hibridomas de péptido 3 se cribaron en paralelo para determinar la ausencia de unión a las proteínas que contienen los dominios EC1-2 de la Cad-8 y MN-Cadherina. Placas EIA de 96 pocillos se revistieron durante la noche a 4°C con 0,05 ml de 0 a 0,3 mg/ml de cada una de las proteínas EC1-2 Cad, o células CHO productos de la proteína de fusión EC1-Fc, y a continuación se lavaron varias veces con suero salino tamponado. A continuación, las placas se bloquearon con 0,25 ml de tampón caseína-PBS y después se lavaron varias veces con suero salino tamponado. El medio de hibridomas que contiene anticuerpos Péptido 3 Cad-11 se incubó puro en cada pocillo durante 1 h a 22°C y a continuación se lavó dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de ratón, se incubaron durante 30 min a 22°C, y a continuación se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo TMB (3,3,5, 5'-tetrametilbencidina) a temperatura ambiente a cada pocillo, y se dejó revelar el color durante 5 min a 22°C. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2 N a temperatura ambiente y la placa se leyó a 450 nm en una placa de microtitulación Wallac 1420.

El medio de los hibridomas de péptido 3 también se analizaron para determinar la capacidad para unirse a la proteína Cad-11 humana expresada en las células. Células 431 D congeladas que expresan Cad-11 se descongelaron y se lavaron dos veces con HBSS con Ca²⁺ y a continuación se resuspendieron a razón de 10⁶ células/ml en HBSS que contiene Ca²⁺. Se tiñeron 10⁵ células/pocillo con un 50 % o 16 % de medio que contiene anticuerpos contra Cad-11 durante 45 min sobre hielo, se lavaron dos veces en HBSS que contiene Ca²⁺, y después se tiñeron con un anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado con fitoeritrina a una concentración del 1 % durante 45 min sobre el hielo y a continuación se lavaron dos veces de nuevo con HBSS que contiene Ca²⁺. A continuación, las células se resuspendieron en 400 µl de HBSS que contiene Ca²⁺ y formaldehído al 1 %, y posteriormente se analizaron en un FACScalibur para determinar las células positivas para PE.

Resultados

5 El medio que contiene anticuerpos contra Cad-11 procedente de los hibridomas de péptido 3 se une a la proteína Cad-11 EC1-2 y a la proteína de fusión EC1-Fc, 28, HL vs CAD11 y HL vs Cad11-EC1, respectivamente), pero no se unen a las proteínas que contienen dominios EC1-2 de Cad-8 y MN-Cad (FIG. 28, HL vs CAD8 y HL vs MNCAD, respectivamente). El medio hibridoma de control no se unió a ninguna de las proteínas cadherina (FIG. 28, Medio vs CAD11, Medio vs CAD8, y Medio vs MNCAD).

10 Los anticuerpos dirigidos contra Cad-11 de los hibridomas de péptido 3 también se unen a las células que expresaban la proteína Cad-11 humana (FIG. 29, véase la flecha), pero no a las células de control que expresan Cad-11 que expresan Neos. Este resultado confirma la presencia de anticuerpos dirigidos contra Cad-11 en los hibridomas que reconocen las células que expresan tanto péptido 3 como Cad-11 *in vitro*.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la SEQ ID NO: 3 en un dominio extracelular 1 (EC1) de una proteína cadherina-11 de mamífero con una afinidad que es al menos 10 veces mayor que la afinidad con la que el anticuerpo se une a las SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio articular en un sujeto mamífero que lo necesite, en donde el anticuerpo se une a un epítipo que comprende la SEQ ID NO: 11.
2. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el trastorno inflamatorio articular se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriática, síndrome de Reiter y espondilitis anquilosante.
3. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto mamífero es un ser humano, o en donde el anticuerpo es para la administración por vía sistémica, intravenosa o por inyección directa en una articulación.
4. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo inhibe migración, adhesión, invasión del cartílago, señalización intercelular de células que expresan dicha proteína cadherina-11 de mamíferos, inducción de la expresión o la actividad de una enzima seleccionada entre el grupo que consiste en una colagenasa, una serina proteasa y una metaloproteasa de la matriz, o inducción de la expresión o la actividad de una citoquina o un factor de crecimiento seleccionados entre el grupo que consiste en IL-6, IL-8, RANKL y TRANCE en una o más articulaciones de dicho sujeto.
5. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es para su administración junto con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, preferentemente en donde el fármaco antirreumático modificador de la enfermedad es metotrexato o en donde el anticuerpo se administra combinado con un agente antiinflamatorio, preferentemente en donde el agente antiinflamatorio es un AINE o un esteroide o en donde, el agente antiinflamatorio es un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad o una proteína recombinante.
6. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo aislado se une a un epítipo que está presente en al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 13, preferentemente en donde el epítipo no incluye la secuencia de aminoácidos EEY.
7. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio articular en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende un anticuerpo aislado que se une específicamente a la SEQ ID NO: 3 en un dominio extracelular 1 (EC1) de una proteína cadherina-11 de mamífero con una afinidad que es al menos 10 veces mayor que la afinidad con la que el anticuerpo se une a las SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 e inhibe la agregación de células que expresan dicha cadherina-11 de mamífero, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo se une a un epítipo que comprende la SEQ ID NO: 11.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo aislado se une a un epítipo que está presente en al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO:13.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que comprende además un agente antiinflamatorio, preferentemente en donde el agente antiinflamatorio es un AINE o un esteroide, o un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, preferentemente en donde el fármaco antirreumático modificador de la enfermedad es metotrexato.
10. Una célula de hibridoma H1M1 que tiene un número de registro ATCC PTA-9699 o de hibridoma H14 que tiene un número de registro ATCC PTA-9701.
11. Un anticuerpo producido mediante el hibridoma H1M1 que tiene un número de registro ATCC PTA-9699 o mediante el hibridoma H14 que tiene un número de registro ATCC PTA-9701.

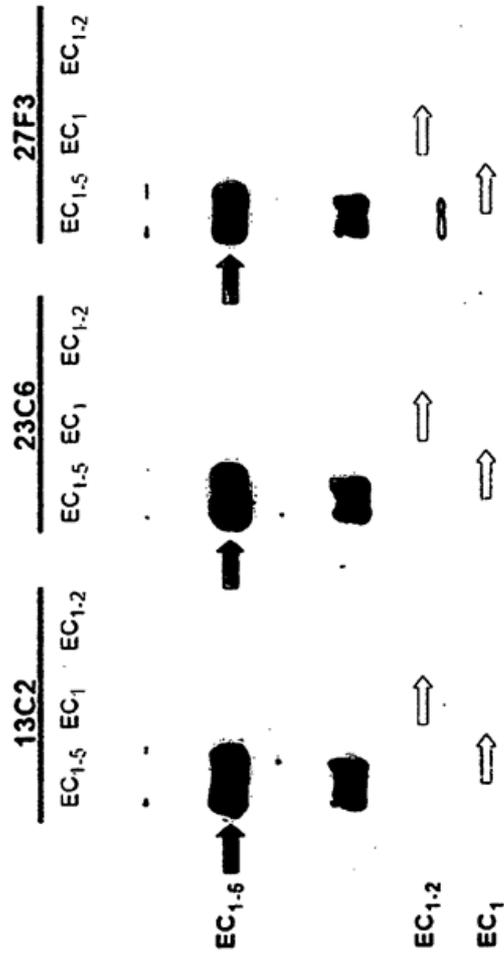


FIG. 1A

Cad-11 humana	<u>GWVWN</u> <u>QFFVI</u> <u>EEYTG</u> <u>PDPVL</u> <u>VGRLH</u> <u>SDIDS</u> <u>GDGN</u> (SEQ ID NO:3)
Cad-8 humana	<u>GWVWN</u> <u>QMFVL</u> <u>EEFSG</u> <u>PEPIL</u> <u>VGRLH</u> <u>TDLDP</u> <u>GSKK</u> (SEQ ID NO:4)
Mn-Cad humana	<u>SWVWN</u> <u>QFFVL</u> <u>EEYTG</u> <u>TDPLY</u> <u>VGKLH</u> <u>SDMDR</u> <u>GDGS</u> (SEQ ID NO:5)

FIG. 2

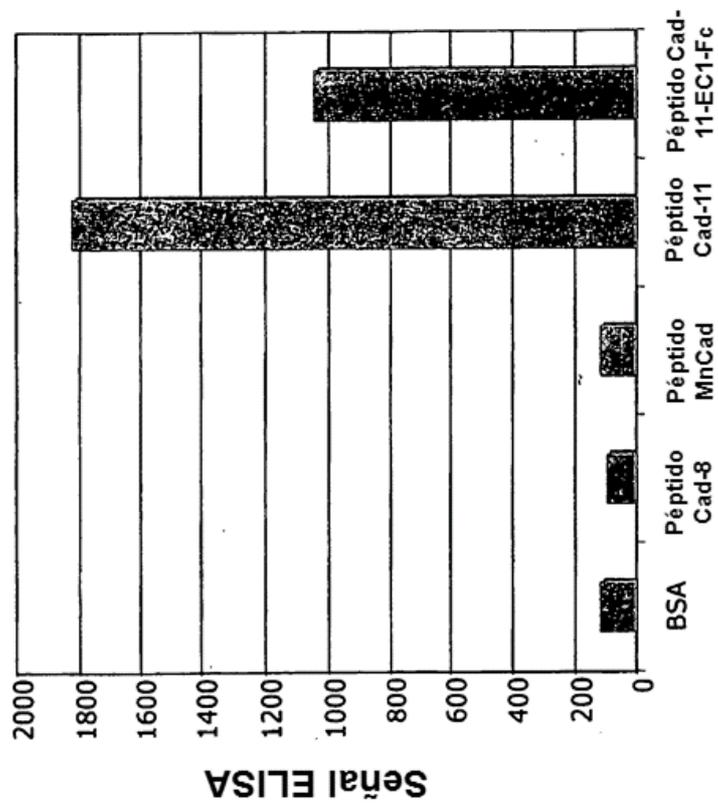
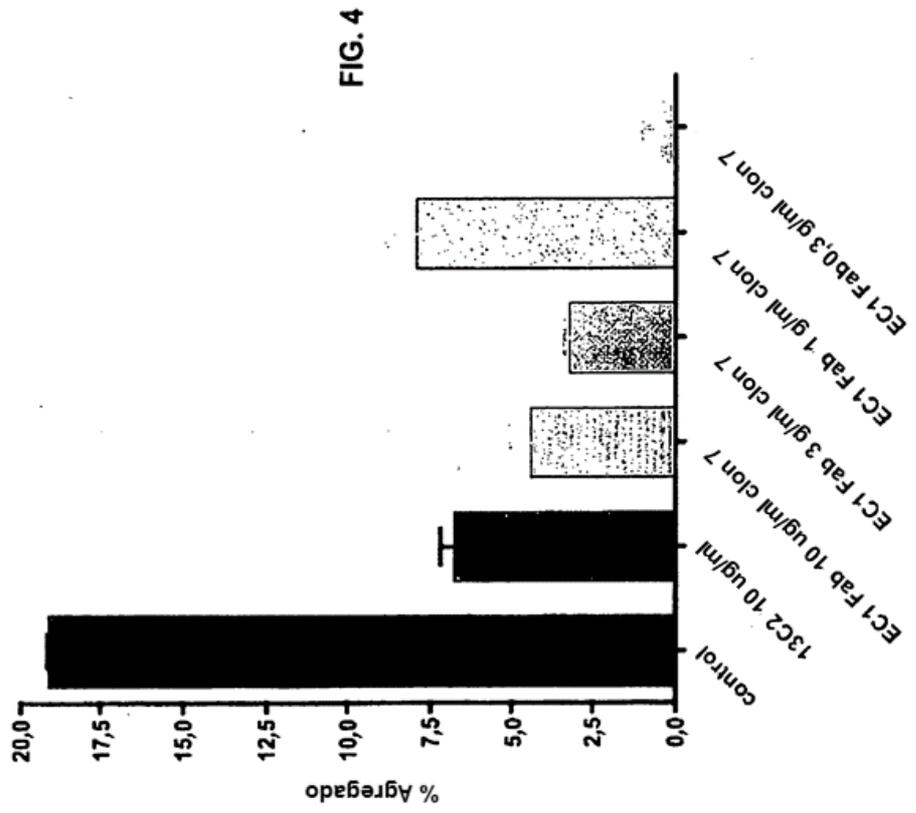


FIG. 3



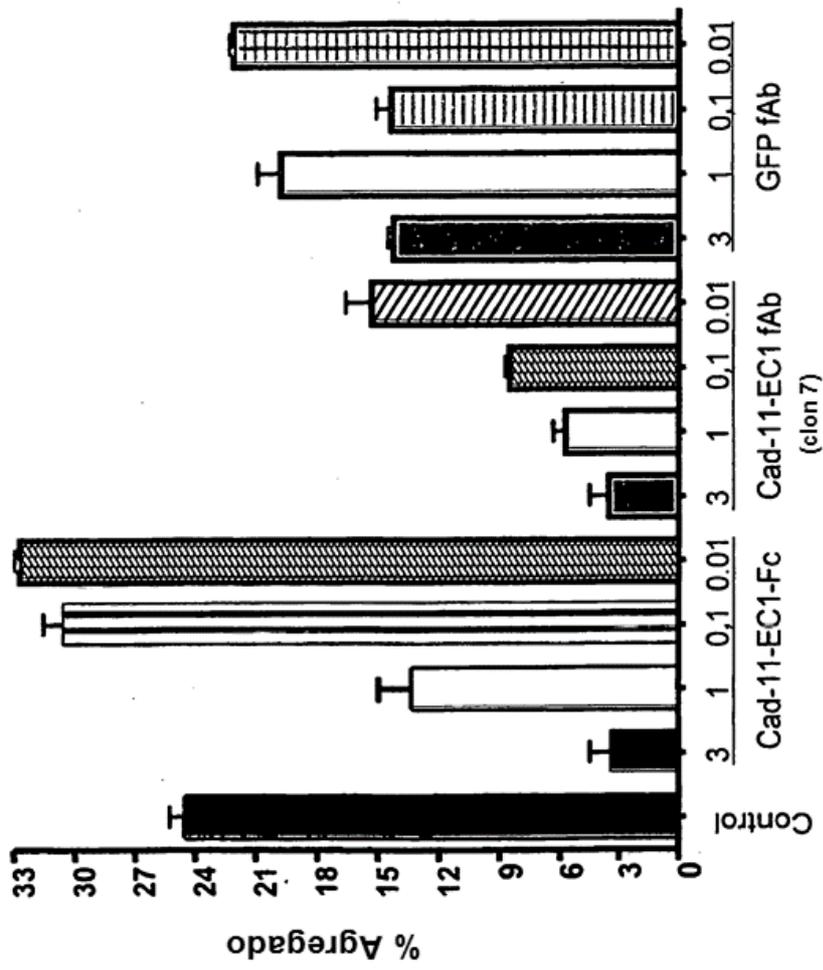


FIG. 5

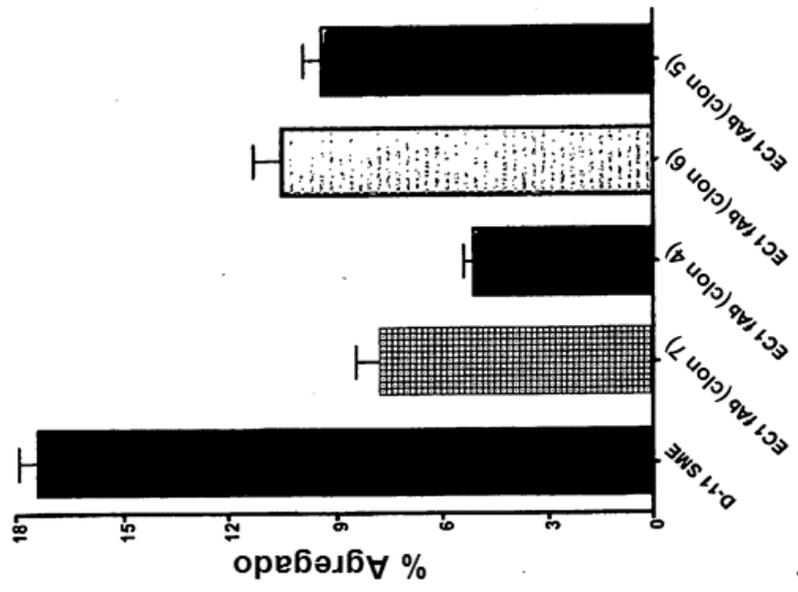


FIG. 6

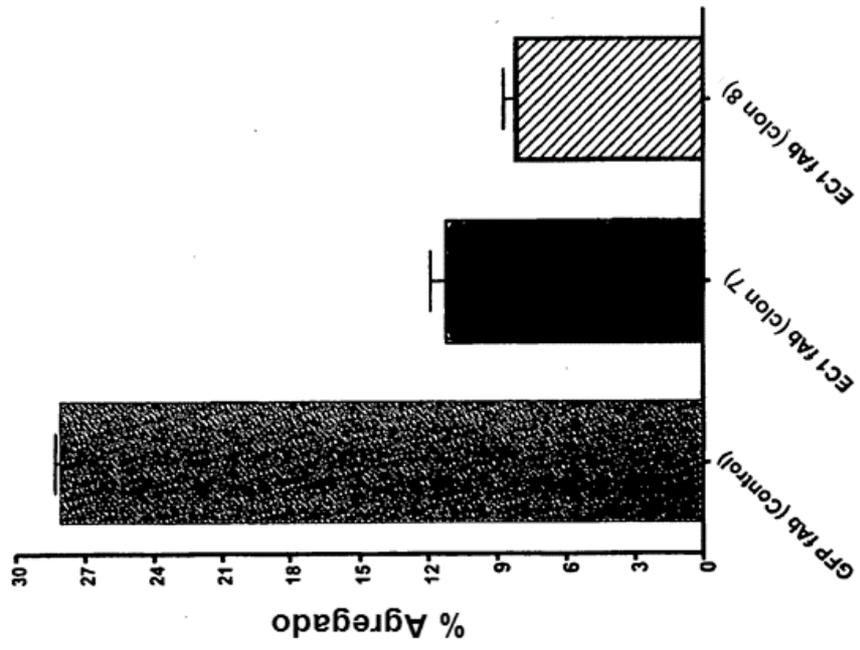


FIG. 7

MKENYCLQAALVCLGMLCHSHAFAPERRGHLRPSFHGHHEKGEQVLQRSKR
GWVWNQFFVIEEYTGPPVLVGRHLSDIDSGDGNIKYILSGEGAGTIFVIDDKSGNI
HATKTLDREERAQYTLMAQAVDRDTNRPLEPPSEFIVKVQ
RSVEPCPAPPVAGPSVFLFPPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGL
PAPIEKTISKKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKVPRLA (SEQ ID NO:7)

FIG. 9

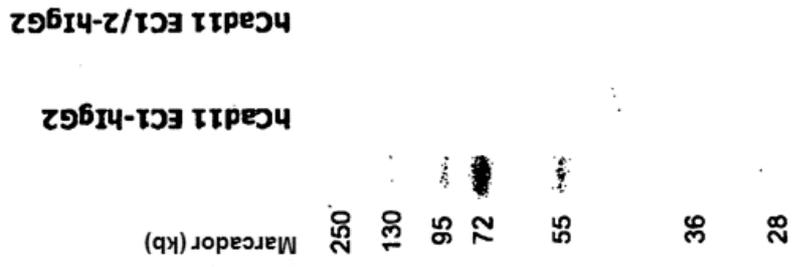


FIG. 10

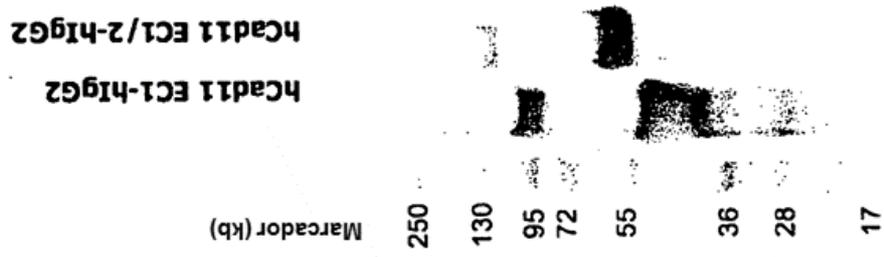


FIG. 11

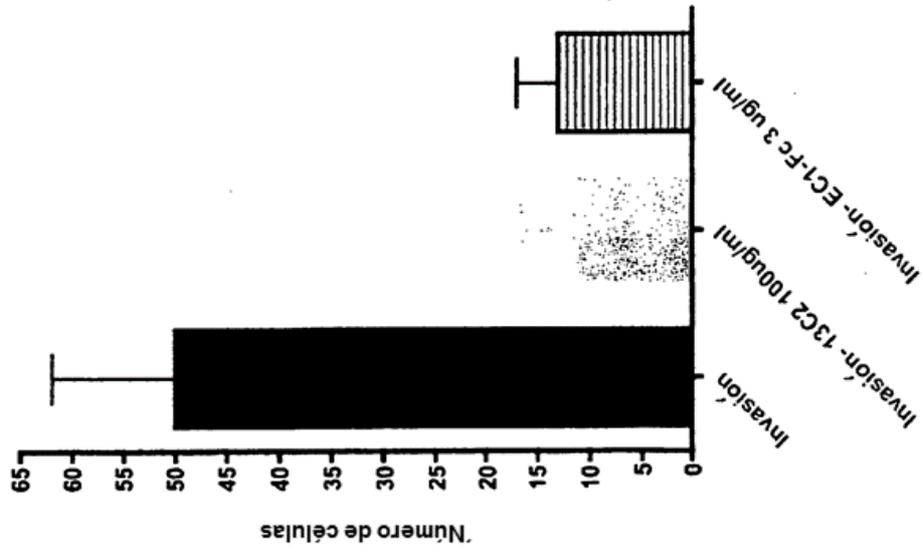


FIG. 12

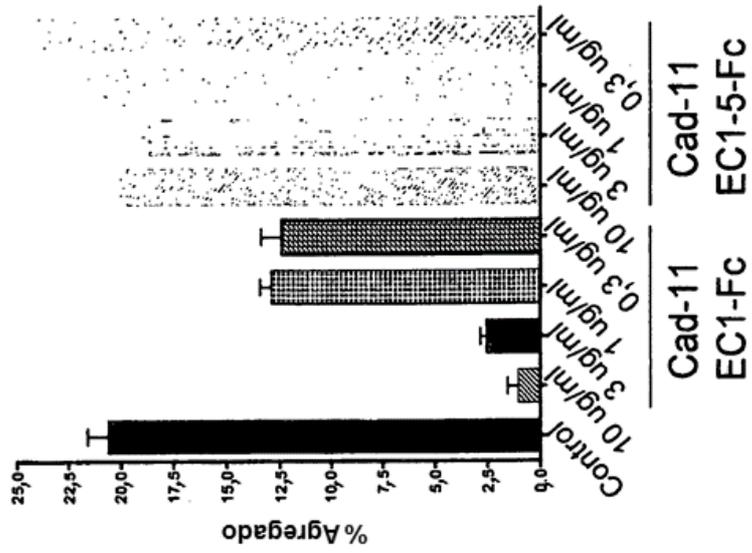


FIG. 13B

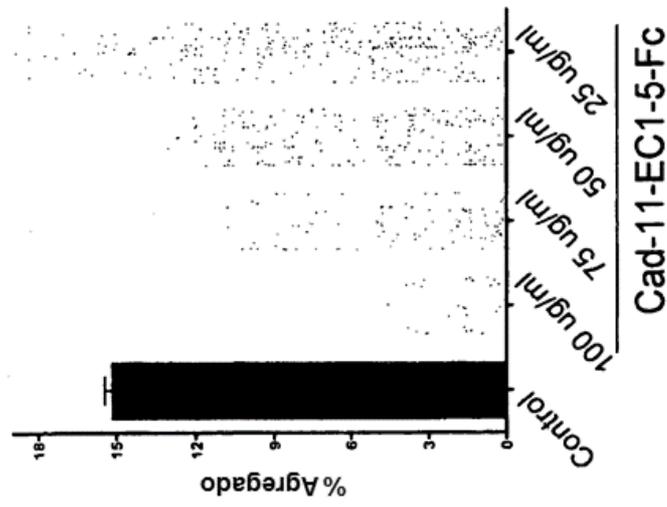


FIG. 13A

1 agatgccgcg ggggccgctc gcagccgccg ctgacttggtg aatgggaccg ggactggggc
 61 cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggactg gcggctcgga ggttgcgctc
 121 accctcaagg gccccagaaa tcaactgtgtt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc
 181 gtgttgatcat ttgttgagt accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc
 241 aagtatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag
 301 ctcaaccagc agagacattc catccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac
 361 cctcagcaag accaccgtac agttggtgga aggggtgaca gctgcattct cctgtgccta
 421 ccacgtaacc aaaaatgaag gagaactact gttacaagc cggcctgggtg tgctgggca
 481 tgctgtgcca cagccatgcc tttgccccag agcggcgggg gcaacctgcg ccctccttc
 541 atgggcacca tgagaagggc aaggaggggc aggtgctaca gcgctccaag cgtggctggg
 601 tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggcc tgaccccggt cttgtgggca
 661 ggcttcattc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcaggggaag
 721 gagctggaac catttttggtg attgatgaca aatcagggaa cattcatgcc accaagacgt
 781 tggatcgaga agagagagcc cagtacagct tgatggctca ggcggtgga agggacacca
 841 atcggccact ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggt ccaggacatt aatgacaacc
 901 ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagaggtcc aatgtgggaa
 961 cgtcagtaat ccaggtgaca gcttcagatg cagatgacce cacttatgga aatagcgcca
 1021 agttagtgtg cagtatctc gaaggacaac cctatcttc ggtggaagca cagacaggtg
 1081 tcatcagaac agccctacc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac cacgtggtg
 1141 tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg gcggactctc agggacaacc aaagtgacga
 1201 tcacactgac cgatgtcaat gacaaccac caaagtttc gcagagcgta taccagatgt
 1261 ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaaagct aaagatccag
 1321 acattggaga aatggctta gtcacataca atattgttga tggagatggt atggaatcgt
 1381 ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg agggggtgat aaagctgaaa aagcctgtag
 1441 attttgaac caaaagagcc tatagcttga aggtagaggc agccaacgtg cacatcgacc
 1501 cgaagtttat cagcaatggc ctttcaagg aactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag
 1561 atgctgatga gccccatg ttcttggccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg
 1621 cagctgctgg caccgtggtt gggagagtgc atgccaaga ccctgatgct gccaacagcc

 FIG. 14A

1681 cgataaggta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag atttttcact attaataccag
 1741 aggatgggtt tattaaaaact acaaaacctc tggatagaga ggaaacagcc tggctcaaca
 1801 tcaactgtctt tgcagcagaa atccacaatc ggcacagga agccaaagtc ccagtggcca
 1861 ttaggggtcct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgccccttat gaaggtttca
 1921 tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag
 1981 atgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatttatctt cagcctacc cctgaaatca
 2041 ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcaggc gtgtacgcc
 2101 ggcgtggagg gttcagtcgg cagaagcagg acttgtacct tctgcccata gtgatcagcg
 2161 atggcggcat cccgcccatg agtagacca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg
 2221 acgtgaacgg ggcactgctc tcctgcaacg cagaggccta cattctgaac gccggcctga
 2281 gcacaggcgc cctgatcgcc atcctcgctc gcatcgtcat tctcctggtc attgtagtat
 2341 tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg
 2401 tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aaggggtg ggaagaagac acagaagcct
 2461 ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca
 2521 tcaaacctga gtatcagtac atgcctagac ctgggctccg gccagcgcgc aacagcgtgg
 2581 atgtc gatga cttcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggctcctc
 2641 cttatgactc cattcaaate tacggttatg aaggcagggg ctcagtggcc gggtcctga
 2701 gctccctaga gtcggccacc acagattcag acttgacta tgattatcta cagaactggg
 2761 gacctcgttt taagaaacta gcagatttgt atggttcca agacactttt gatgacgatt
 2821 cttacaata acgatacaaa tttggcctta agaactgtgt ctggcgttct caagaatcta
 2881 gaagatgtgt aaacaggtat ttttttaaat caaggaaagg ctcatttaaa acaggcaaag
 2941 ttttacagag aggatacatt taataaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga
 3001 aatacctttt ctcacaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaacttcg ctagaaaaaa
 3061 aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg
 3121 aagggaaatt gtttatgtgt tatgaacatc caagtcttct tctttttta agttgtcaaa
 3181 gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttcgc cttaactct
 3241 ggacactcta tatgtagtgc attttttaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa
 3301 cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcacc aatcttgta
 3361 ctgctgatcc ttgtaaatct ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgccagat

FIG. 14B

ES 2 611 102 T3

3421 ataactgtct tgtttcagtg agagacgccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt
3481 tgtacaattt taaagttctt attttagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa
3541 gaaaatgtta cggcatcaca cttatatatt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag
3601 cttcaatata agaagcaatc tttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa (SEQ
ID NO:1)

FIG. 14C

1 mkenyclqaa lvclgmlchs hafaperrgh lrpsfhghhe kgkegqvlqr skrgwvmqf
 61 fvieeytgpd pvlvgrlhsd idsgdgniky ilsgegagti fviddksgni hatktdree
 121 raqytlmaqa vdrdtnrple ppsefivkvq dindnppefl hetyhanvpe rsnvgtsviq
 181 vtasdadpt ygnsaklvys ileggpyfsv eaqtgiirta lpmndreake eyhvviqakd
 241 mgghmgglsg ttkvtitltd vndnppkfpq svyqmsvsea avpgeevgrv kakdpdigen
 301 glvtynivdg dgmesfeitt dyetqegvik lkkpvdftk rayslkveaa nvhidpkfis
 361 ngpfkdtvtv kisvedadep pmflapsyih evqenaaagt vgrvhakdp daanspirys
 421 idrhtldrf ftinpedgfi kttkpldree tawlnitvfa aeihnrhgea kvpvairvld
 481 vndnapkfaa pyegficesd qtkplsnppi vtisaddkdd tangprfifs lppeiinhpn
 541 ftvrndrnt agvyarrggf srqkqdlyll pivisdggip pmsstntlti kvcgcdvnga
 601 llscnaeayi lnaglstgal iailacivil lvivvlfvtl rrqkkepliv feeedvreni
 661 itydeggege edteafdiat lqmpdgingf iprkdikpey qymprpgrlp apnsvdvddf
 721 intriqeadn dptappydsi qiygyegrgs vagslssles attdsdldyd ylnwgpfrfk
 781 kladlygskd tfddd (SEQ ID NO: 2)

FIG. 15

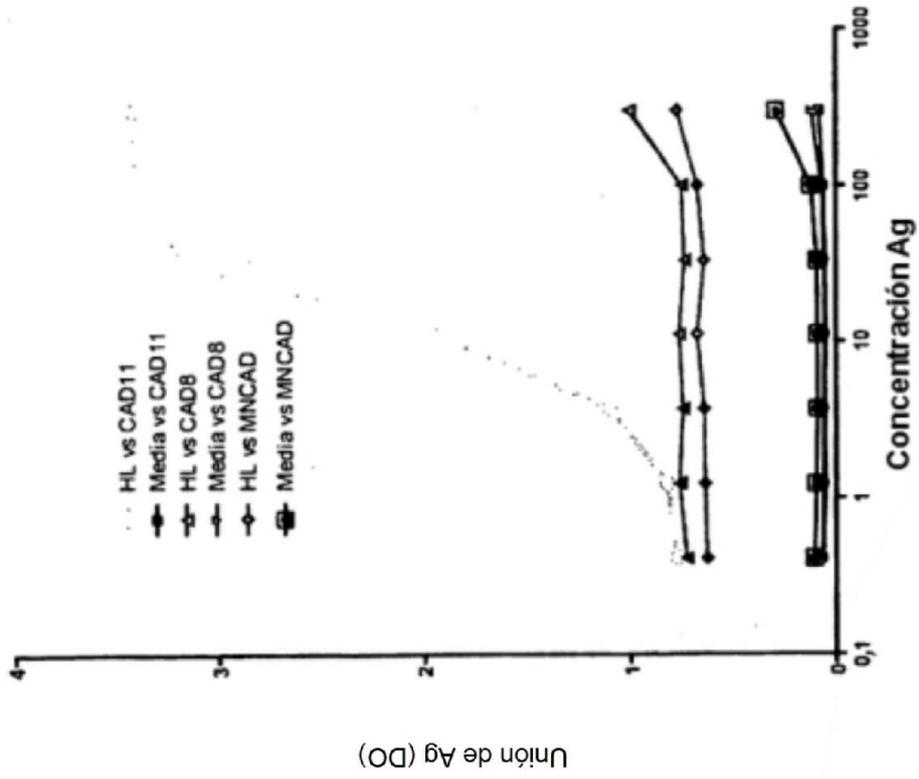
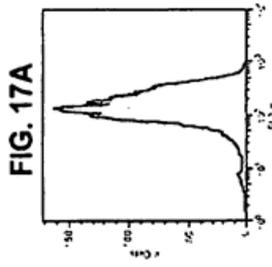
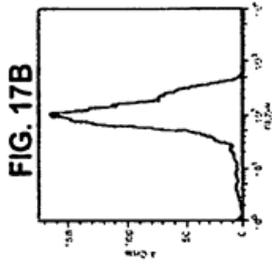
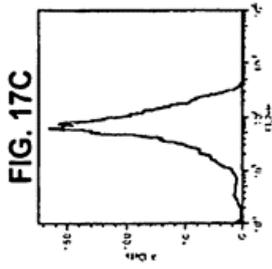
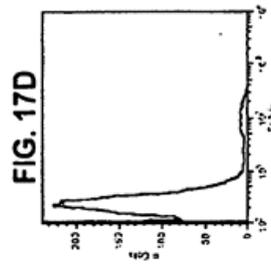
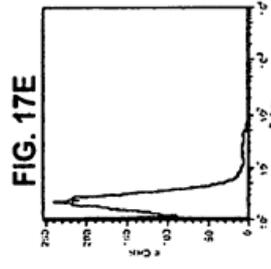
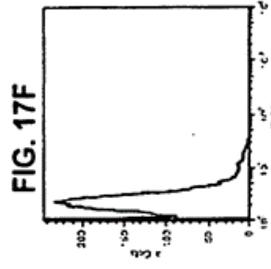


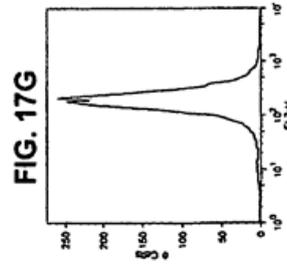
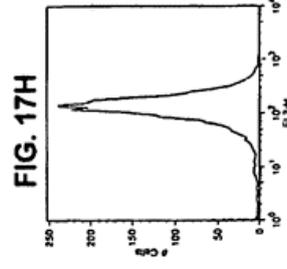
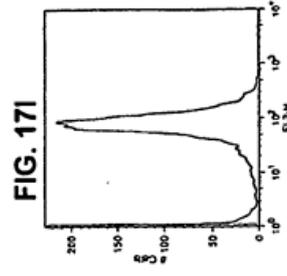
FIG. 16



**Células
H14 Cad11 +**



**Células
H14 Cad11 +**



**Células
H14 Cad11 +**

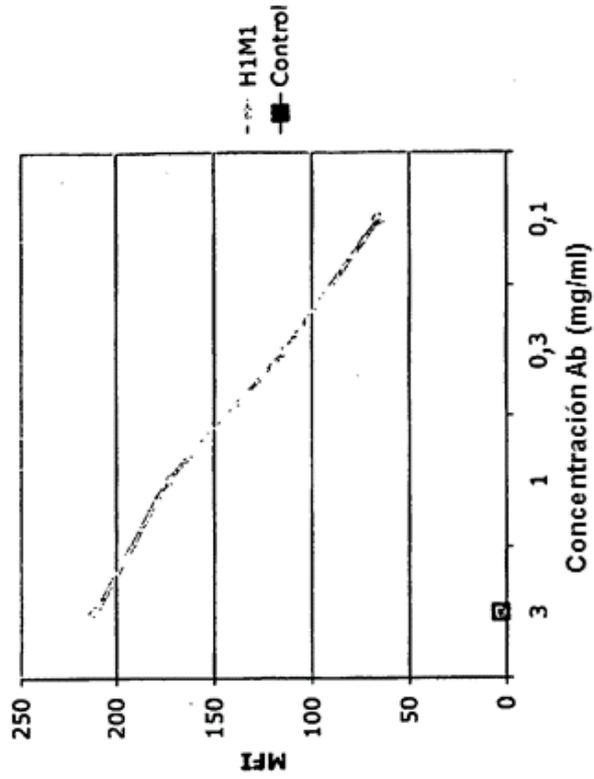


FIG. 18B

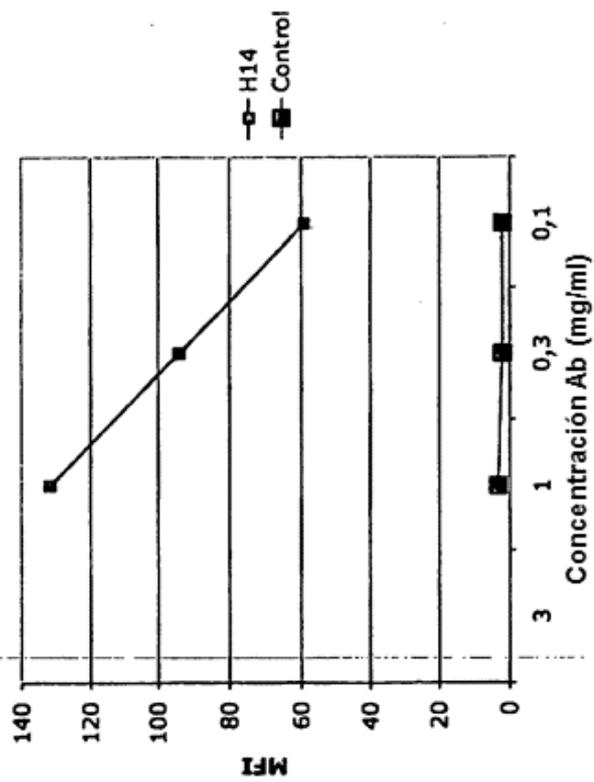
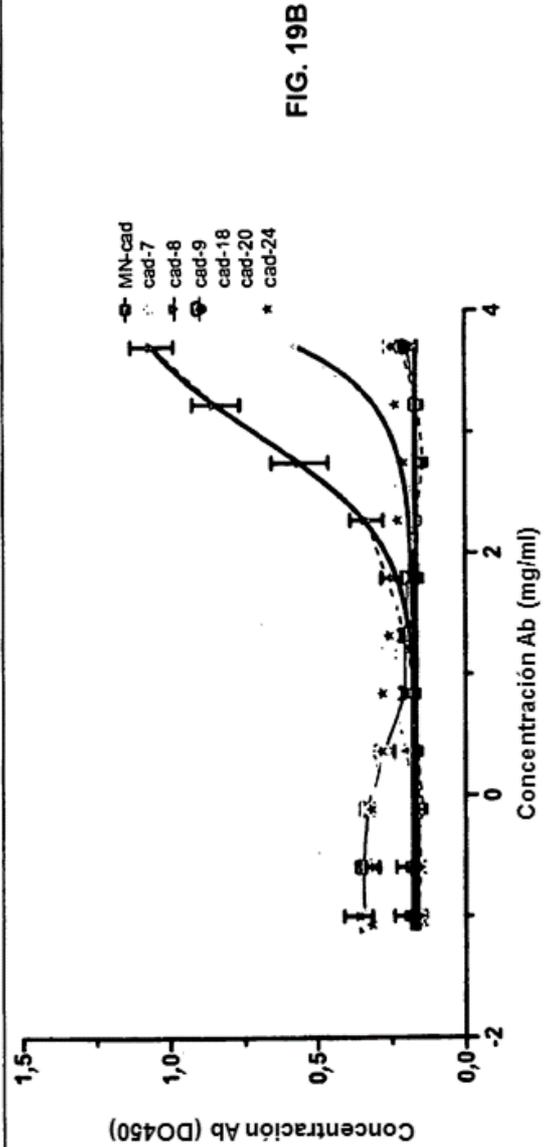
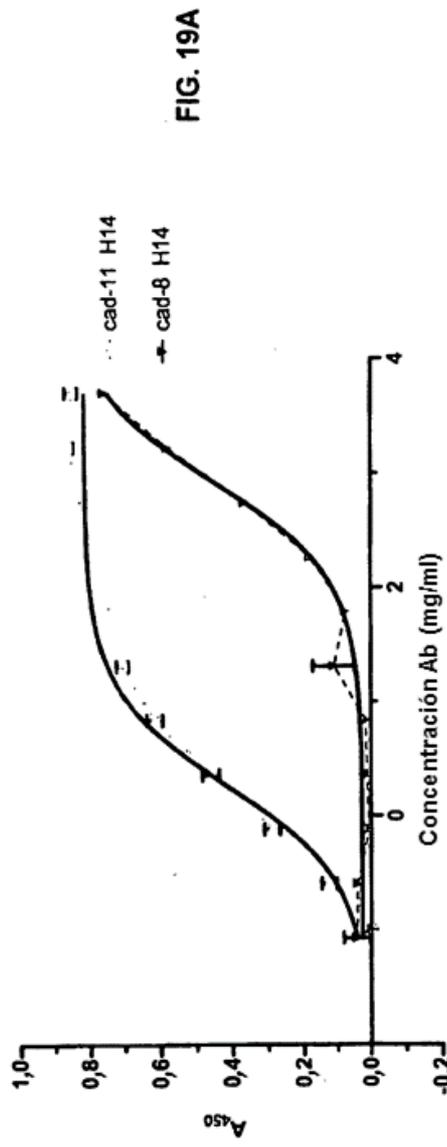


FIG. 18A



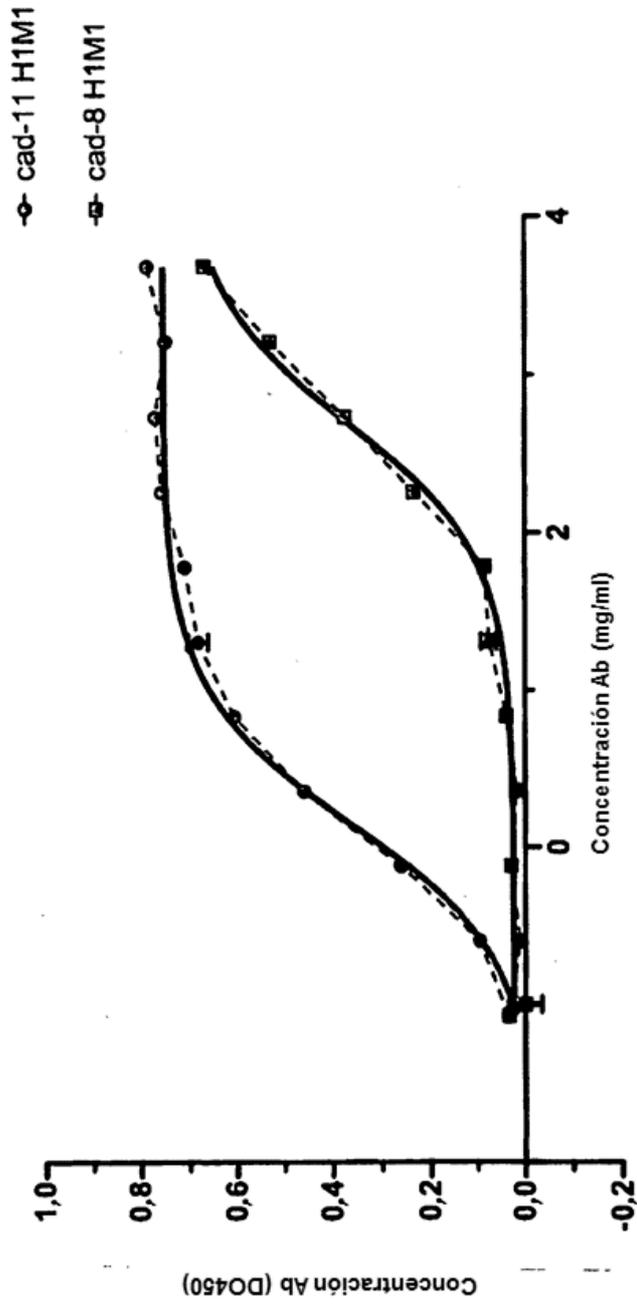
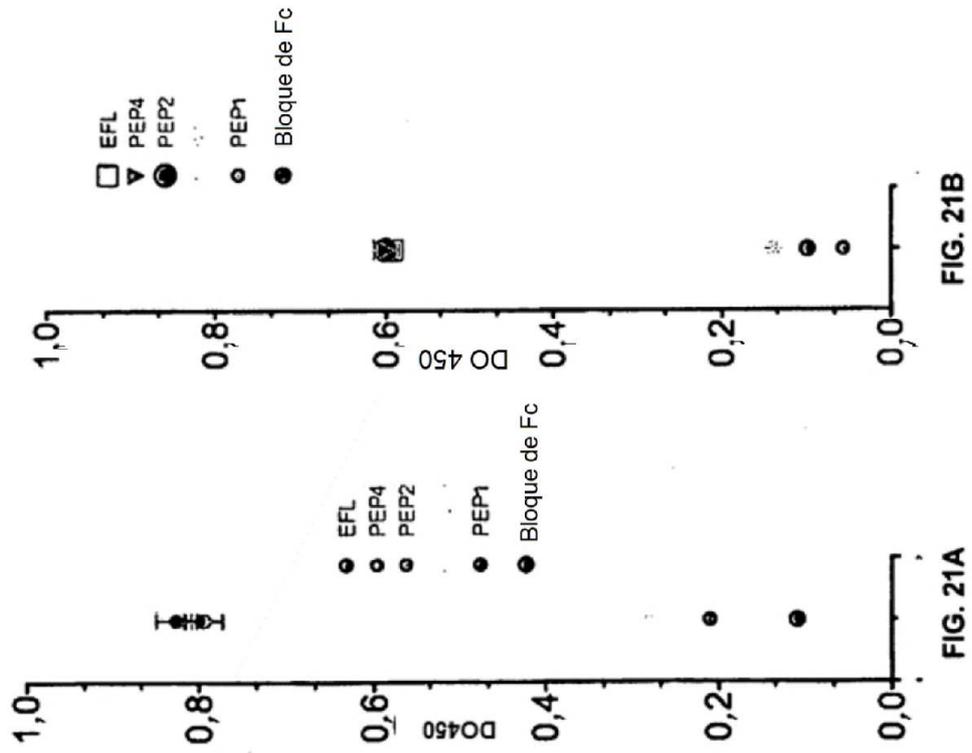


FIG. 20



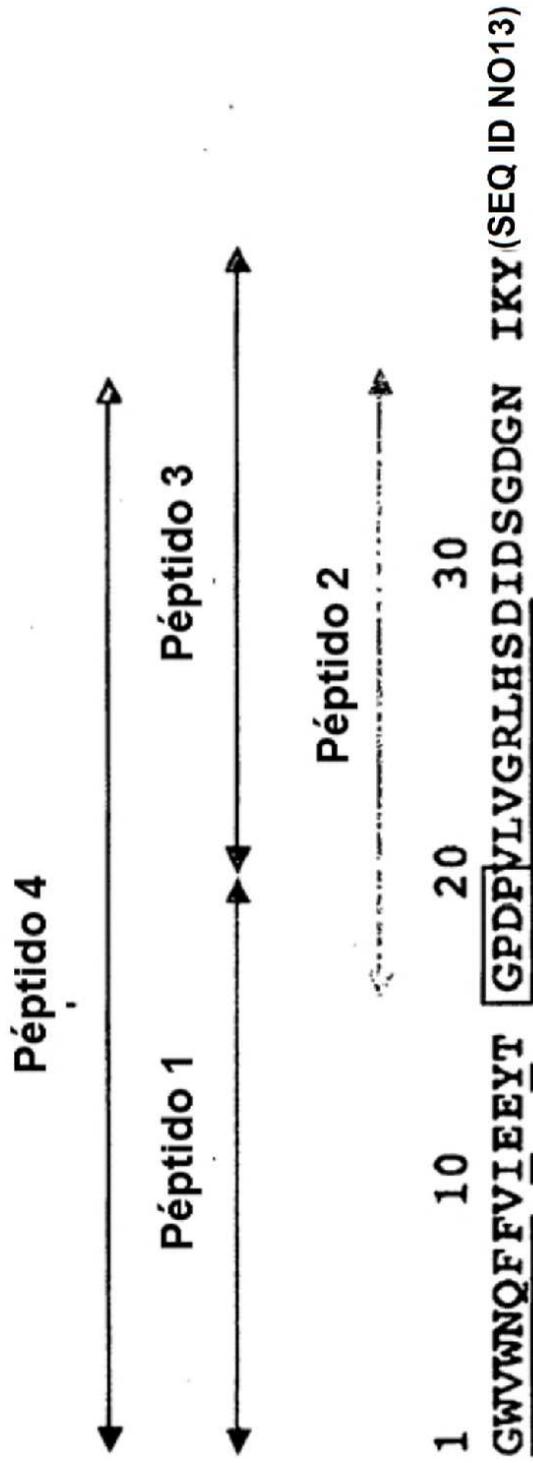


FIG. 22

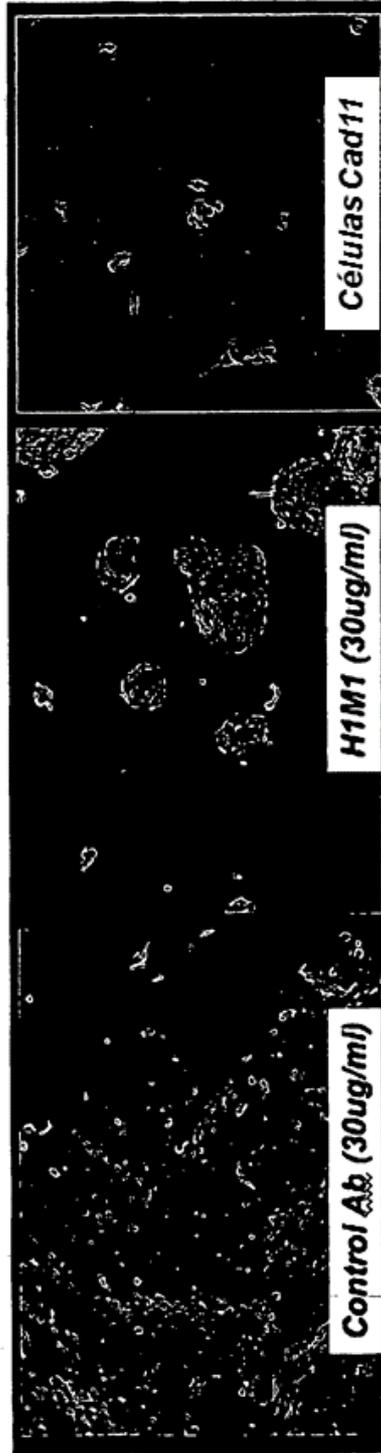


FIG. 23A

FIG. 23B

FIG. 23C

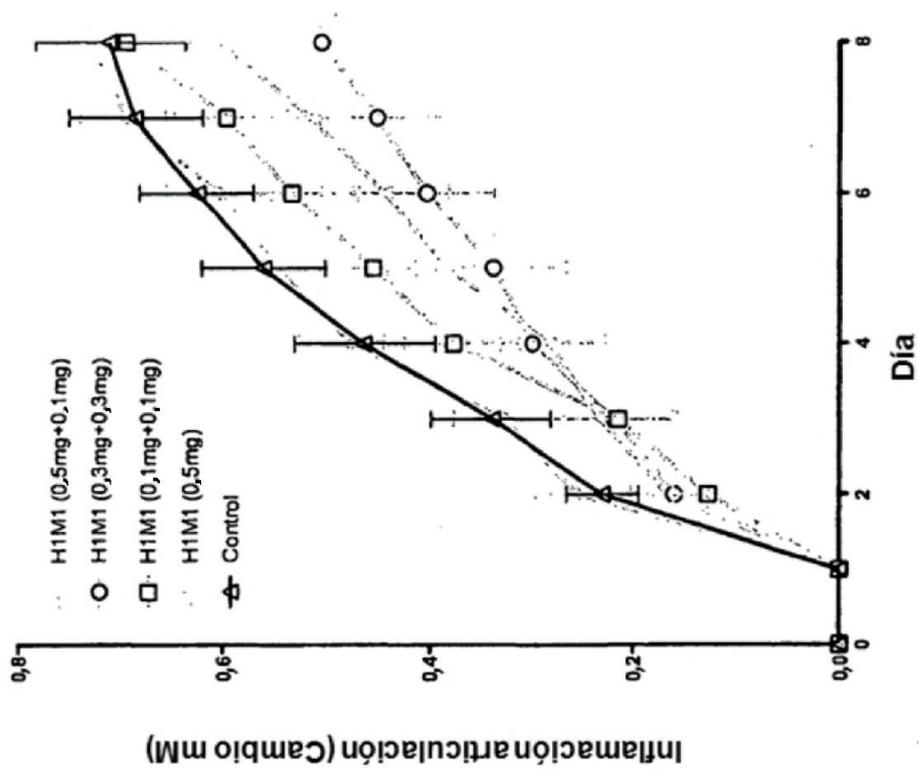


40X

FIG. 24A

FIG. 24B

FIG. 25



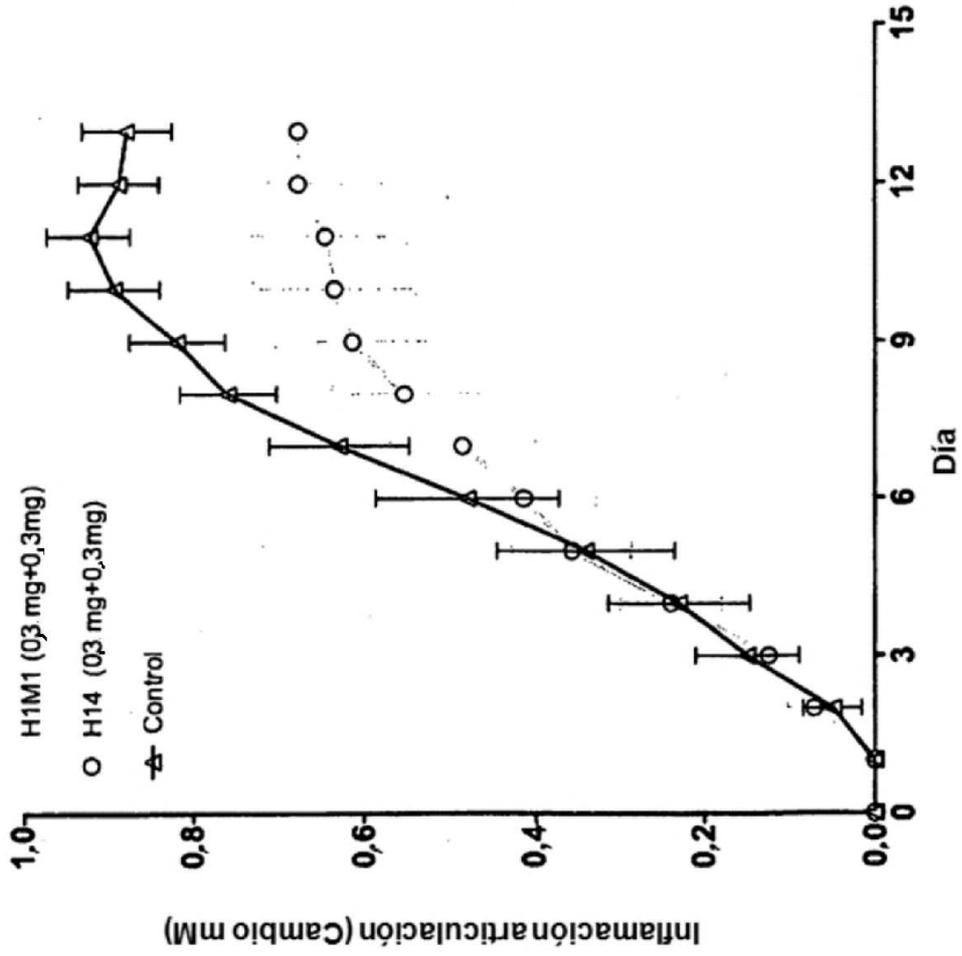
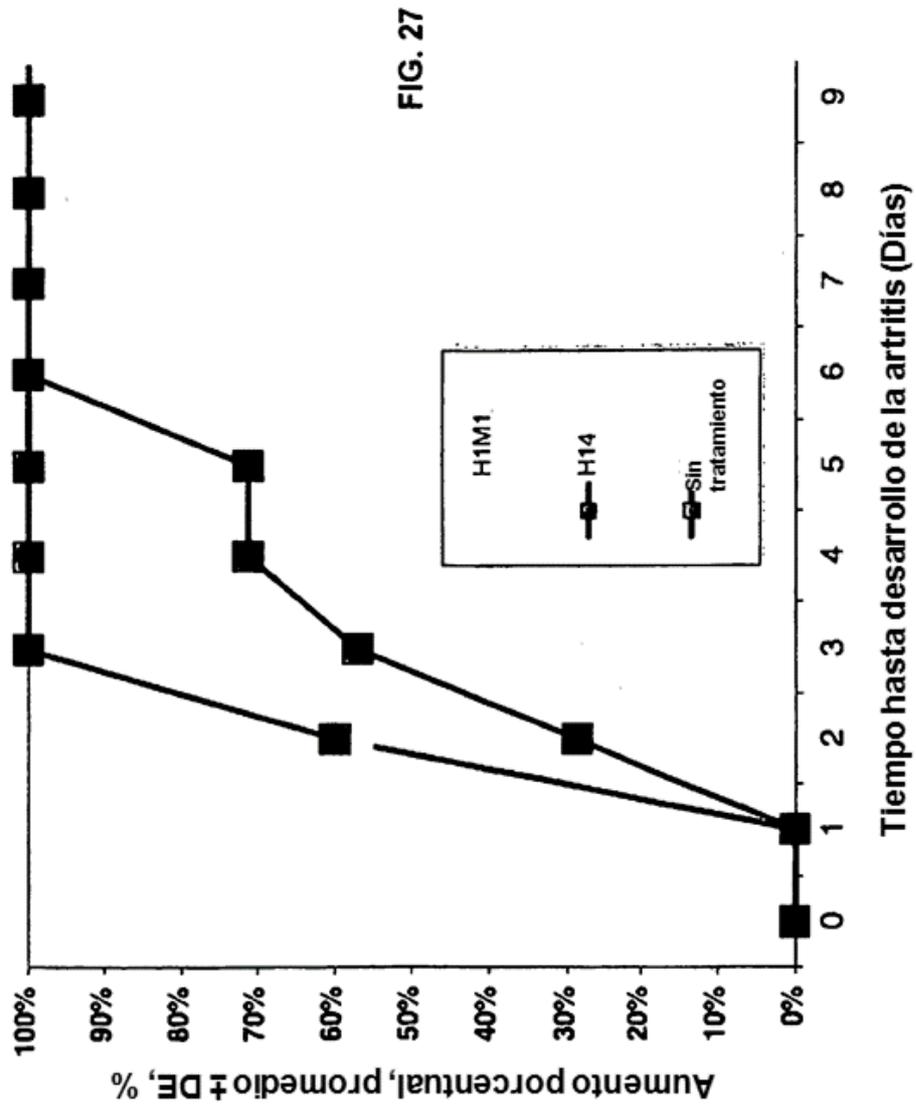
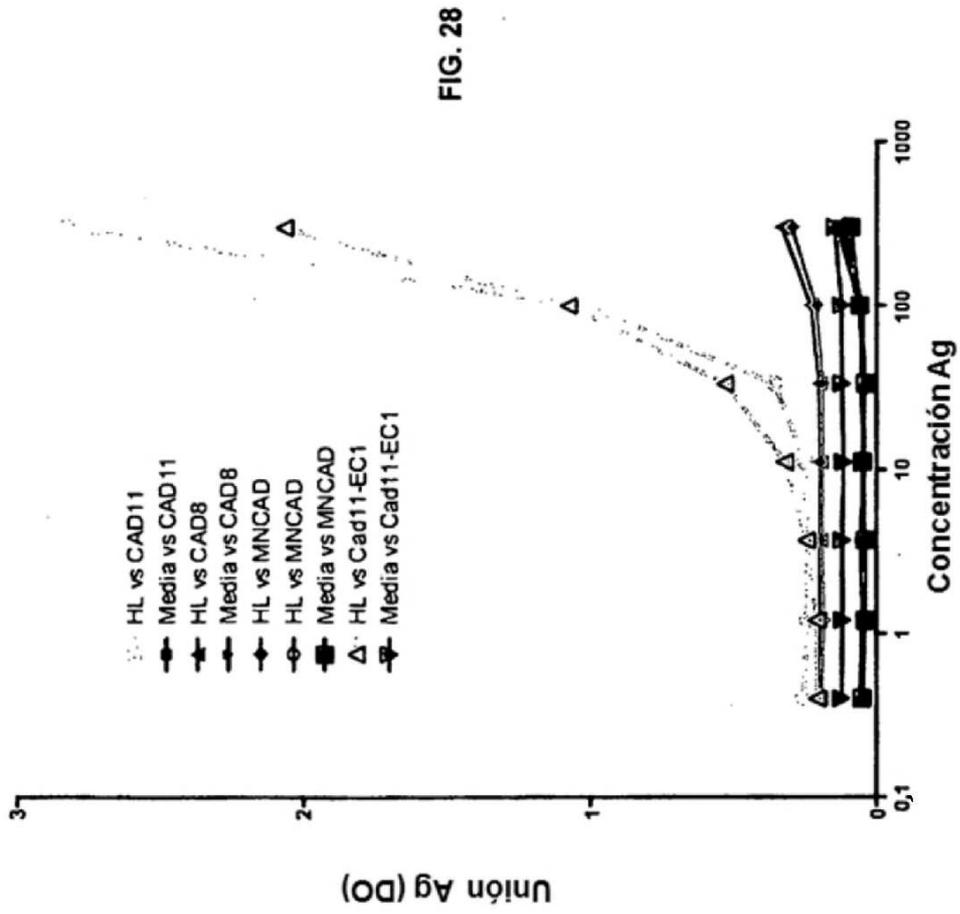


FIG. 26





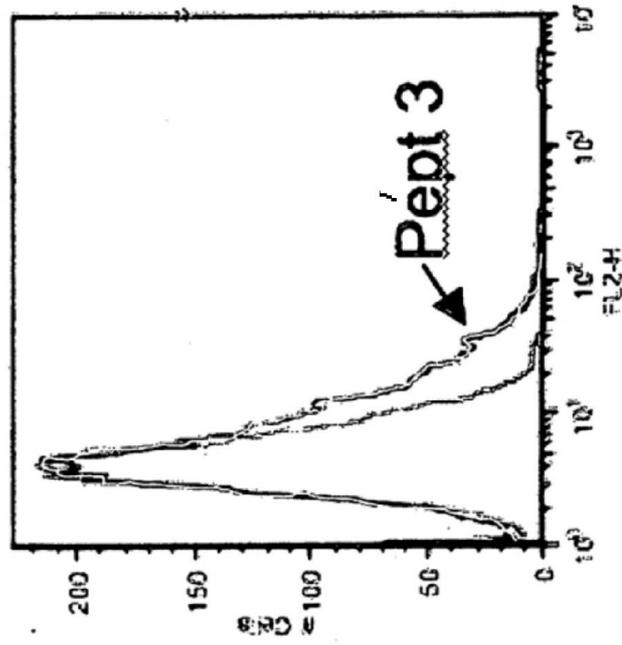


FIG. 29